

FT-ICR-massenspektrometrische Untersuchungen zur Fragmentierung isomerer Oligosaccharide

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Kiel 2013

vorgelegt von
Andrea Hahn
aus Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. J. Grotemeyer

Gutachter: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2013

Zum Druck genehmigt: 07.06.2013

Kurzzusammenfassung

In dieser Arbeit werden zwei neue Ansätze zur Fragmentierung und Unterscheidung von isomeren Oligosacchariden beschrieben.

Zum einen wurde die Photodissoziation von Oligosacchariden mit sichtbarem Licht (VisPD) durchgeführt. Als Analysator wurde dabei ein Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) verwendet. Maltopentaose (MP), Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) und Lacto-N-fucopentaose II (LNFP II) wurden zur Verbesserung der Absorption mit verschiedenen Chromophoren derivatisiert. Je nach verwendeter Ionenspezies des Derivats werden unterschiedliche Fragmentierungsmuster beobachtet. Die Ionen fragmentieren überwiegend durch glycosidische Bindungsbrüche. Intensive Ringbrüche finden nur bei der deprotonierten Spezies $[\text{MP} - \text{H}]^-$ statt. Bei allen protonierten Spezies $[\text{M} + \text{H}]^+$ werden überwiegend Y-Typ-Ionen gebildet. In den Spektren der Spezies $[\text{M} + \text{Na}]^+$, $[\text{M} + \text{K}]^+$ und $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+}$ dominieren B- und Y-Typ-Ionen, aber auch C-Typ-Ionen und ein intensiver $^{0,1}\text{A}$ -Bindungsbruch am reduzierenden Ende wird beobachtet. Bei der VisPD der Spezies $[\text{M} + \text{H} + \text{Li}]^{2+}$, $[\text{M} + \text{H} + \text{Na}]^{2+}$ und $[\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ werden B- und Y-, aber auch Z- und C-Typ-Ionen gebildet. Eine massenspektrometrische Unterscheidung der Isomere LNFP I und LNFP II ist anhand dieser Fragmentspektren und der Fragmentspektren der deprotonierten Derivate $[\text{M} - \text{H}]^-$ möglich. Bei der VisPD entstehen eine größere Anzahl von Fragmenten als bei der Collision Induced Dissoziation (CID).

Zum anderen wurden dimere und trimere Cluster von LNFP I und LNFP II massenspektrometrisch untersucht. Die dimeren Cluster $[2\text{M} + \text{H} + \text{A}]^{2+}$ bzw. $[2\text{M} + \text{B}]^{2+}$ bilden sich bei Additiv-Ionenradien zwischen 113 pm und 164 pm. Als Additive wurden dabei (A) Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ und NH_4^+ oder (B) Sr^{2+} und Ba^{2+} verwendet. Bei Ionenradien zwischen 132 pm und 152 pm besitzen die Cluster zusätzlich ein auffälliges Fragmentierungsverhalten. In den CID-Spektren dieser Cluster ($[2\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$, $[2\text{M} + \text{Sr}]^{2+}$ und $[2\text{M} + \text{Ba}]^{2+}$) können dimere Clusterfragment und auch isomerenspezifische Signale identifiziert werden.

Abstract

In this work two new approaches to fragmentate and differentiate isomeric oligosaccharides are described.

Firstly, the photodissociation of oligosaccharides with visible light (VisPD) was performed. A Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer (FT-ICR-MS) was used as mass analyzer. The oligosaccharides Maltopentaose (MP), Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) and Lacto-N-fucopentaose II (LNFP II) were labeled with different chromophores. Depending on the ion species that was used as precursor different fragmentation patterns are observed. The ions fragment mainly by glycosidic bond cleavages. Intense cross-ring cleavages occur only with the deprotonated species $[MP-H]^-$. In the protonated species $[M+H]^+$ Y-type ions are formed predominantly. The spectra of the species $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ and $[M+2Na]^{2+}$ are dominated by Y- and B-type ions, but C-type ions and an intense $^{0,1}A$ -cleavage at the reducing end are observed as well. Using VisPD for the species $[M+H+Li]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ and $[M+H+K]^{2+}$ B- and Y- as well as Z- and C-type ions are observed. Based on those mass spectra and the mass spectra of the deprotonated derivatives the differentiation of the isomers LNFP I and LNFP II is possible. VisPD creates a larger number of fragments than Collision Induced Dissociation (CID).

Secondly various dimeric and trimeric clusters of LNFP I and LNFP II were analyzed by mass spectrometry. The dimeric clusters $[2M+H+A]^{2+}$ and $[2M+B]^{2+}$ are formed when the radius of the ionic additive lies between 113 pm and 164 pm. Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ and NH_4^+ (A) or Sr^{2+} and Ba^{2+} (B) are used as additives. When the radius of the ion lies between 132 pm and 152 pm the clusters show distinctive fragmentation behavior. In the CID-spectra of those clusters ($[2M+H+K]^{2+}$, $[2M+Sr]^{2+}$ and $[2M+Ba]^{2+}$) the formation of dimeric cluster-fragments and specific isomeric fragments are observed.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Oligosaccharide und instrumentelle Grundlagen	5
2.1	Oligosaccharide in der Muttermilch	5
2.2	Massenspektrometrie von Oligosacchariden	7
2.2.1	Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-MS	8
2.2.2	Elektrospray-Ionisation	11
3	Tandem-Massenspektrometrie von Oligosacchariden	15
3.1	Fragmentierungsmuster bei Oligosacchariden	15
3.1.1	Nomenklatur der Fragmente nach Domon und Costello	16
3.2	Fragmentierungsmuster und Umlagerungsreaktionen	17
3.2.1	Protonierte Ionen	17
3.2.2	Adduktionen	19
3.2.3	Deprotonierte Ionen	22
3.2.4	Umlagerungen	24
3.3	Fragmentierungsmethoden	26
3.3.1	Collision-Induced Dissociation (CID)	26
3.3.2	Photodissoziationsmethoden (PD)	27
3.3.3	Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (IRMPD)	28
3.3.4	Vakuumultraviolett-Photodissoziation (VUVPD) und Ultraviolett- Photodissoziation (UVPD)	29
3.3.5	Photodissoziation im sichtbaren Spektralbereich (VisPD)	31
3.4	Derivatisierung von Oligosacchariden	31
4	Material und Methoden	35
4.1	Das Massenspektrometer	35

4.2	Material	38
4.3	Probenvorbereitung	38
4.4	Auswertung, Benennung und Beschriftung der Moleküle und Fragmente .	39
5	VisPD und CID der protonierten Oligosaccharide	41
5.1	VisPD und CID der Maltopentaose-Derivate	41
5.1.1	VisPD von Maltopentaose-Proflavin (MP-PF) und Maltopentaose-Propidiumiodid (MP-PI)	42
5.1.2	VisPD und CID von Maltopentaose-2-Aminoazotoluol (MP-2AT) und Maltopentaose-Rhodamin 110 (MP-Rh110)	44
5.2	VisPD und CID der LNFP I-Derivate und LNFP II-Derivate	48
5.2.1	Lacto-N-fucopentaose I-Rhodamin 110 (LNFP I-Rh110) und Lacto-N-fucopentaose II-Rhodamin 110 (LNFP II-Rh110)	48
5.2.2	Lacto-N-fucopentaose I-6-Aminoquinolin (LNFP I-AMQ)	52
5.3	VisPD von Oligosaccharid-Farbstoff-Clustern	54
5.3.1	Clusterverhalten von LNFP II mit verschiedenen Farbstoffen . . .	54
5.3.2	VisPD von $[\text{LNFP II} + \text{AMQ} + \text{H}]^+$	55
5.4	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	56
6	CID der dimeren und trimeren Cluster	61
6.1	Bildung von Alkali-Adduktionen von LNFP I und LNFP II	62
6.1.1	Übersichtsspektren von LNFP I und LNFP II ohne Zugabe von Additiven	62
6.1.2	Übersichtsspektren	65
6.1.3	Fragmentierungseffizienzen der verschiedenen Adduktionen bei IR-Einstrahlung	65
6.1.4	Zugabe von Alkaliionen	67
6.2	CID-Spektren verschiedener Alkali-Adduktionen von LNFP I und LNFP II	68
6.2.1	CID von einfach geladenen Oligosaccharid-Monomeren	68
6.2.2	CID von zweifach geladenen Oligosaccharid-Dimeren	69
6.2.3	CID von $[\text{3LNFP II} + 2\text{Na}]^{2+}$ und $[\text{3M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$	72
6.3	Bildung und Fragmentierung von weiteren dimeren Clustern	74
6.3.1	IMRPD von $[\text{2LNFP II} + \text{H} + \text{NH}_4]^{2+}$	74
6.3.2	CID von $[\text{2LNFP I} + \text{Sr}]^{2+}$ $[\text{2LNFP II} + \text{Sr}]^{2+}$	74
6.3.3	CID von $[\text{2LNFP I} + \text{Ba}]^{2+}$ und $[\text{2LNFP II} + \text{Ba}]^{2+}$	76

6.3.4	CID von $[3\text{LNFPI}+\text{Sr}]^{2+}$ und $[3\text{LNFPI}+\text{Ba}]^{2+}$	78
6.4	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	78
7	VisPD der Alkali-Adduktionen	83
7.1	Bildung der Adduktionen bei LNFPI-Rhodamin 110	83
7.2	VisPD und CID der Adduktionen von LNFPI-Rh110 und LNFPII-Rh110	85
7.2.1	VisPD und CID der einfach geladenen Monomere	85
7.2.2	Zweifach geladene Adduktionen	87
7.3	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	98
8	VisPD der deprotonierten Oligosaccharide	103
8.1	Maltopentaose	103
8.2	LNFPI und LNFPII	108
8.3	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	111
9	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	115
A	Derivatisierung und Fragmentierungsverhalten	119
A.1	Derivatisierung der Oligosaccharide	119
A.1.1	Auswahl der Chromophore	119
A.1.2	Derivatisierung und Aufreinigung	121
A.2	Fragmentierungsverhalten der Derivate	125
A.2.1	Absorption und Fragmentierungsverhalten der Label	125
A.2.2	Abhängigkeit der Fragmentierung von der Laserwellenlänge und der Laserleistung	127
B	Anhang	131
B.1	Tabellenanhang	132
B.2	Spektrenanhang	137
	Literaturverzeichnis	144

Abkürzungsverzeichnis

2AT 2-Aminoazotoluol

ACN Acetonitril

AMQ 6-Aminoquinolin

CAD Collisionally Activated Dissociation

CID Collision-Induced Dissociation

cw Continous Wave

DA DataAnalysis

DMSO Dimethylsulfoxid

ECD Electron Capture Dissociation

ESI Elektrospray-Ionisation

EtOH Ethanol

F Fragment

FAB Fast Atom Bombardment

FS Farbstoff

FT Fouriertransformation

FT-ICR-MS Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer

Fuc Fucose

Gal Galactose

Glc Glucose

Inhaltsverzeichnis

GlcNAc N-Acetylglucosamin

HexNAc N-Acetylhexosamin

HPLC High-Performance Liquid Chromatography

IRMPD Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation

KZ Koordinationszahl

Le Lewis

LNFP I Lacto-N-fucopentaose I

LNFP II Lacto-N-fucopentaose II

LSTc LS-Tetrasaccharid c

LTQ Lineare Ionenfalle

MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation

MeOH Methanol

MP Maltopentaose

MS Massenspektrometrie

Neu5Ac N-Acetylneuraminsäure

OPO-Laser Optisch parametrischer Oszillator-Laser

PD Photodissoziation

PF Proflavin

PI Propidiumiodid

QIT Quadrupolionenfalle

RF-trapping Radiofrequenz

Rh110 Rhodamin 110

SPE Solid Phase Extraction

TOF Time-Of-Flight

UHV Ultrahochvakuum

UVPD Ultraviolett-Photodissoziation

VisPD Visuelle-Photodissoziation

VUVPD Vakuum-Ultraviolett-Photodissoziation

1

Kapitel 1

Einleitung

Die Meinung, dass Saccharide nur strukturstabilisierende Funktionen besitzen oder als Energielieferanten dienen, ist durch eine Vielzahl von Untersuchungen widerlegt.[1] Glycane sind nicht nur "Verunreinigung der Proteine" sondern diese Strukturen sind maßgeblich an den unterschiedlichsten biologischen Vorgängen beteiligt. Dazu gehören u.a. die Zellerkennung, Signalweitergabe, Immunabwehr und die Beeinflussung der Darmflora.[1, 2, 3, 4] Mit der Glycomik hat sich ein Forschungsgebiet etabliert, dass die Untersuchung der Glycan-Strukturen zum Ziel hat. Von Interesse ist dabei die Auswirkung der Glycosilierung der Proteine und die Funktionen dieser Biomoleküle.

Die Analytik von Saccharidstrukturen hat sich in den letzten 30 Jahren deutlich weiterentwickelt. Anfang der 80er Jahre konnte die Strukturaufklärung von Glycanen nur in wenigen Laboratorien durchgeführt werden und selbst Anfang der 90er Jahre konnte eine Strukturanalyse noch bis zu einem Jahr dauern.[2] Heute können Saccharidstrukturen sehr viel schneller identifiziert werden, was insbesondere auf die Fortschritte in der Massenspektrometrie zurückzuführen ist. Vor allem die Tandem-Massenspektrometrie ist bei der Strukturaufklärung von komplexen Oligosacchariden ein unverzichtbares Instrument geworden. Doch auch mit dieser Methodik ist die Identifizierung von isomeren Strukturen noch schwierig und erfordert die Kombination verschiedener Analysetechniken, wie z.B. der Chromatographie und enzymatischer Methoden.[5]

Saccharide sind in ihrer Struktur sehr vielseitig. Sie können aus verschiedenen Monomeren aufgebaut sein und sich in ihrer Monomerenabfolge oder in ihrer Konnektivität unterscheiden. Abb. 1.1 zeigt vier isomere Oligosaccharide, die Bestandteile von Blutgruppenantigenen sind. Obwohl diese Strukturen aus den gleichen fünf Monomeren aufgebaut sind, unterscheiden sie sich in ihrer biologischen Funktion deutlich.[6]

1 Einleitung

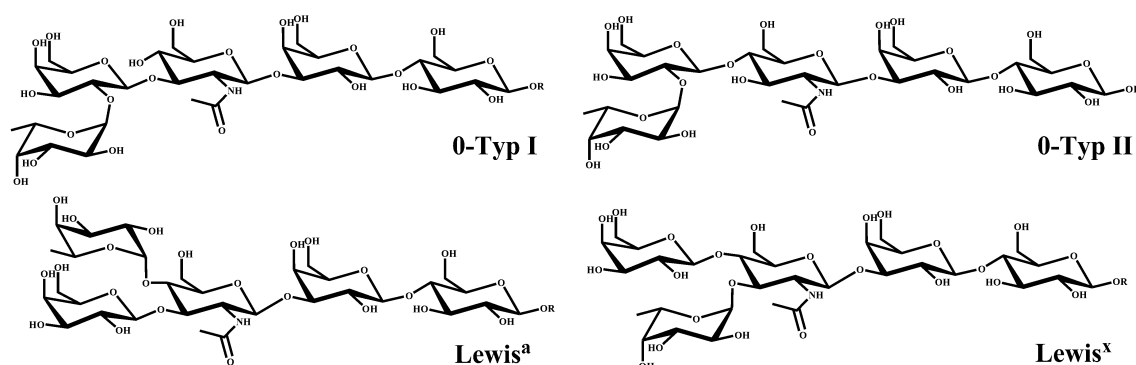


Abbildung 1.1: Bestandteile von Blutgruppenantigenen: (oben links) 0-Typ I, (oben rechts) 0-Typ II, (unten links) Lewis^a, (unten rechts) Lewis^x.

In dieser Arbeit wurden zwei neue Ansätze zur Unterscheidung von isomeren Sacchariden untersucht. Als Analyte wurden hierfür Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) und Lacto-N-fucopentaose II (LNFP II) verwendet. Diese kommen in Konzentrationen von 1,2 g/l bis 1,7 g/l und 0,3 g/l bis 1,0 g/l in reifer Muttermilch vor.[7] Die beiden Isomere sind insbesondere von Interesse, da sie Strukturähnlichkeiten zu den AB0 und Lewis (Le) Blutgruppenantigenen aufweisen. LNFP I weist dabei Blutgruppe 0-Typ I-Aktivität und LNFP II weist Le^a-Aktivität auf.[8] Zur Strukturaufklärung und Unterscheidung von Isomeren sind isomerenspezifische Bindungsbrüche und Fragmente erforderlich. Glycosidische Bindungsbrüche geben Hinweise auf die Sequenz der Saccharide, wohingegen Ringbrüche auch Informationen über die Konnektivität der Oligosaccharide bieten. Bei niederenergetischen Anregungsmethoden wie der Collision Induced Dissociation (CID) oder der Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (IRMPD) finden hauptsächlich glycosidische Bindungsbrüche statt. Bei höherenergetischen Anregungsmethoden wie der Collision Activated Dissociation (CAD) werden vermehrt auch Ringbrüche beobachtet.

Die IRMPD ist eine Photodissoziationsmethode, die mit einem FT-ICR-MS experimentell sehr einfach zu kombinieren ist.[9] Ihre Bedeutung für die Saccharidanalytik hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen.[10, 11, 12, 13, 14]

In dieser Arbeit wird zunächst die Verwendung einer anderen Photodissoziationsmethode für Oligosaccharide vorgestellt. Bei der Visuellen-Photodissoziation (VisPD) werden mit einem Argon-Ionen Laser Wellenlängen zwischen 457 nm und 514 nm verwendet. Die Photonen besitzen Energien zwischen 2,4 eV und 2,7 eV pro Photon. Die Photodissoziation im sichtbaren Bereich wurde bereits von *Enjalber et al.* zur Fragmentierung eines derivatisierten Disaccharids verwendet.[15] Die saccharidspezifischen Fragmente zeigen jedoch nur Signalintensitäten unter 5 % und die Spektren besitzen wenig Aussagekraft.

Die VisPD liegt energetisch zwischen der IRMPD und der Ultravioletten Photodissoziation (UVPD). Bei der IRMPD entstehen überwiegend Fragmente aus glycosidischen Bindungsbrüchen, wohingegen bei der höherenergetischen UVPD auch Ringbrüche beobachtet werden.[16]

Die hier vorgestellte VisPD führt bei geringer Laserleistung zu signalintensiven Spektren mit hohem strukturellen Informationsgehalt. Es werden isomerenspezifische Fragmente gebildet, was eine Unterscheidung der Isomere ermöglicht.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit wird auf die Verwendung verschiedener Adduktionenspezies gelegt. Gewöhnlich werden bei der Tandem-MS von Oligosacchariden die Natrium-Adduktionen als Vorläuferionen verwendet. Doch die Fragmentierung von anderen Ionenspezies bietet häufig alternative strukturelle Informationen. In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von ein- und zweiwertigen Spezies auf ihr Fragmentierungsverhalten untersucht.

Auch dimere und trimere Cluster, die aus zwei oder drei Oligosacchariden bestehen (z.B. $[2M+H+K]^{2+}$ und $[3M+H+K]^{2+}$), wurden mittels CID fragmentiert und massenspektrometrisch untersucht. Diese Cluster zeigen eine auffällige Stabilität und ein außergewöhnliches Fragmentierungsverhalten. Auch anhand dieser Fragmentmassenspektren können die isomeren Oligosaccharide LNFP I und LNFP II eindeutig unterschieden werden.

Kapitel 2

2 Oligosaccharide und instrumentelle Grundlagen

2.1 Oligosaccharide in der Muttermilch

Saccharide stellen eine der größten Naturstoffgruppen dar und besitzen eine immense Strukturvielfalt.[1, 17] Sie sind als Monomere, als Oligosaccharide aber auch als Polysaccharide mit Molekulargewichten über 1 MDa bekannt.[18] Im Unterschied zu anderen Biopolymeren, wie z.B. den Proteinen und den Nukleinsäuren, können Saccharide auch stark verzweigte Strukturen ausbilden. Diese Strukturen gewinnen durch ihre vielseitigen Verknüpfungsmöglichkeiten zusätzlich an Komplexität.

In der Natur dienen diese Saccharide zur Strukturstabilisierung und Energiebereitstellung. Darüber hinaus spielen sie, alleine oder als Bestandteil von Makromolekülen, bei vielen biologischen Vorgängen eine Rolle. Der Großteil der in Zellen vorkommenden Saccharide sind an Proteine oder Lipide gebunden und werden als Glycoproteine, Proteoglycane oder Glycolipide bezeichnet.[17] Der Saccharidanteil der Glycoproteine und Glycolipide wird Oligosaccharid oder Glycan genannt. Eine andere Definition von Oligosacchariden besagt, dass diese aus zwei bis zehn Monosacchariden aufgebaut sind [19], doch diese Definition wird nicht streng verwendet und der Übergang von Oligosaccharid zu Polysaccharid ist fließend.

In Muttermilch kommen ungebundene Oligosaccharide in Konzentrationen von 5 g/l bis 8 g/l vor und zählen damit neben der Lactose, den Lipiden und den Proteinen mengenbezogen zu den wichtigsten Komponenten.[7]

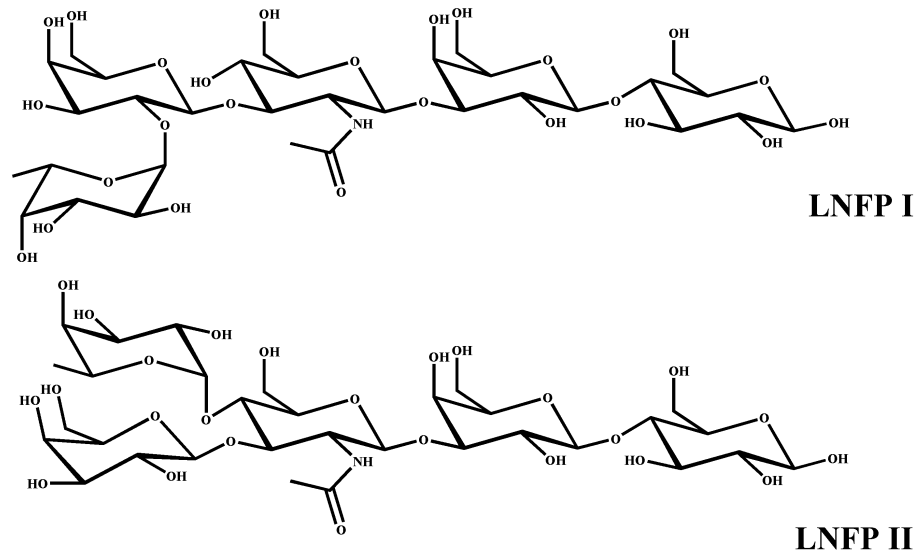


Abbildung 2.1: Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) und Lacto-N-fucopentaose II (LNFP II).

Bereits Mitte der 50er Jahre wurde nachgewiesen, dass Oligosaccharide in Muttermilch die Darmflora von Neugeborenen positiv beeinflussen.[20] Mittlerweile werden noch weitere bioaktive Wirkungen vermutet.[21] So zeigen *in-vitro*-Studien, dass diese Komponenten eine potentielle Wirkung als rezeptorähnliche Strukturen besitzen, welche die Anhaftung von pathogenen Bakterien und Viren an Epithelzellen verhindern.[22, 23, 24] Gegenstand der Forschung ist auch der Einfluss von Oligosacchariden auf entzündliche Vorgänge, da diese als Liganden von Zelladhäsionsmolekülen fungieren können.[25]

Durch das zunehmende Interesse an dieser Substanzklasse und durch immer empfindlichere Nachweismethoden, wie der Elektrospray-Ionisation-MS (ESI-MS) und der Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS) in Kombination mit chromatographischen Trennmethoden konnten mittlerweile mehr als 130 freie Oligosaccharide in der Muttermilch nachgewiesen werden. Diese Saccharide, die auf Lactose basieren, wurden größtenteils eindeutig charakterisiert.[26, 27, 28]

Zu diesen Oligosacchariden gehören auch die isomeren Moleküle Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) und Lacto-N-fucopentaose II (LNFP II) (Abb. 2.1), die in Konzentrationen von 1,2 g/l bis 1,7 g/l bzw. 0,3 g/l bis 1,0 g/l in reifer Muttermilch vorkommen.[7] Sie werden aus Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Glucose (Glc) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) aufgebaut (Abb. 2.2) und weisen Strukturähnlichkeiten zu den AB0 und Lewis Blutgruppenantigenen auf (Abb. 1.1).[8]

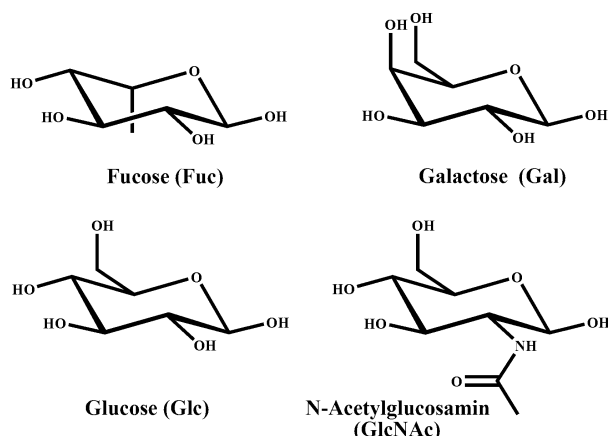


Abbildung 2.2: Monosaccharide, aus denen LNFP I und LNFP II aufgebaut werden: Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Glucose (Glc) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc).

2.2 Massenspektrometrie von Oligosacchariden

Durch die große Strukturvielfalt der Oligosaccharide ist deren Analytik nach wie vor sehr aufwendig und erfordert meist eine Kombination aus verschiedenen Analysetechniken, wie z.B. der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), chromatographischen Trennmethode, enzymatischen Methoden und der Massenspektrometrie.[29]

Die Massenspektrometrie ist eine sensitive und präzise Detektionsmethode, die mittlerweile ein zentraler Bestandteil der Saccharidanalytik ist. Insbesondere die Anwendung der Tandem-Massenspektrometrie, die zusätzliche Fragmentinformationen bietet, gewinnt immer mehr an Bedeutung bei der Strukturaufklärung komplexer Strukturen.[30, 31, 32]

Die ersten Oligosaccharide, die massenspektrometrisch untersucht wurden, konnten mittels Fast Atom Bombardment (FAB) ionisiert werden. Dabei lagen die Analyte gewöhnlich als Natrium-Adduktionen ($[M + Na]^+$) vor. Bei negativer Ionisation mittels FAB wurden die deprotonierten Ionen meist aus peracetylierten Sacchariden gebildet.[33]

Durch die Entwicklung der ESI und der MALDI konnte die Ionisationseffizienz der Analyte verbessert und eine einfache Kopplung mit der High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ermöglicht werden.[31, 32] Diese Kopplung erweitert die Anwendungsmöglichkeiten der MS maßgeblich.

Unter den verwendeten Massenspektrometern sind Quadrupolionenfallen (QIT) und Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) besonders zur Aufklärung komplexer Strukturen geeignet. Sie bieten die Möglichkeit Ionen

zu speichern und erlauben eine mehrstufige Ionenisolation, Anregung und Massenanalyse (MS^n). Das FT-ICR-MS hat dabei gegenüber der QIT zusätzlich den Vorteil, dass die Ionen hochauflösend detektiert werden können.

2.2.1 Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer

Durch die Verwendung der Fouriertransformation (FT) bei der ICR-MS wird eine simultane Anregung und eine Breitband-Detektion verschiedener Ionen ermöglicht, was die Messzeit deutlich reduziert. Diese Kombination wurde 1974 zum ersten Mal von *A.G. Marshall* beschrieben.[34] Seit der Einführung der FT-ICR-MS hat diese Methode immer mehr an Bedeutung gewonnen. Besonders bei der Strukturaufklärung von komplexen Analyten, wie Proteinen oder Sacchariden, bietet sie durch hochauflösende MS und MS^n -Verfahren viele Vorteile. Das Kernstück eines FT-ICR-MS ist eine ICR-Zelle. In dieser Zelle findet je nach angelegten Potentialen die Speicherung, Anregung und Detektion der Ionen statt. Schon 1936 beschrieb *F.M. Penning* als Erster, dass bei einem angelegten axialen Magnetfeld die Speicherzeiten von geladenen Teilchen in einem koaxialen Zylinder verlängert werden.[35] Die Funktion der Speicherung, Anregung und Detektion in einer ICR-Zelle wird im Folgenden kurz und schematisch erläutert:

Auf ein Ion der Masse m und Ladung z , welches sich mit der Geschwindigkeit v ($\neq 0$) in einem räumlich homogenen Magnetfeld $B = -B_0 k$ befindet, wirkt die Lorentzkraft F_L .

$$F_L = m \frac{dv}{dt} = z v \times B \quad (2.1)$$

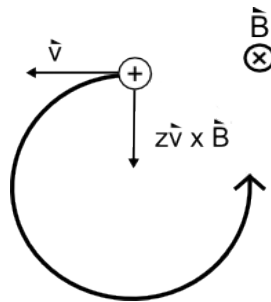


Abbildung 2.3: Kreisbewegung eines Kations in einem Magnetfeld B .

Bei einer parallelen Orientierung des Magnetfeldes zur z-Achse eines kartesischen Koordinatensystems kreist das Ion in der x-y-Ebene unabhängig von der Anfangsgeschwindigkeit mit einer ungestörten Ionen-Zyklotron-Frequenz (Abb. 2.3).

$$\omega_c = \frac{zB_0}{m} \quad (2.2)$$

Zur Beschränkung der Ionenbewegung in z-Richtung wird ein axiales, elektrostatisches, quadrupolares Trapping-Potential angelegt, ein sogenanntes Penningfallen-Potential.

Dieses Potential reduziert die ungestörte Zyklotronfrequenz zur sogenannten reduzierten Zyklotronfrequenz ω_+ (Gl. 2.3), zur Magnetronfrequenz ω_- (Gl. 2.4) sowie einer axialen Trapping-Oszillation mit der Eigenfrequenz ω_z (Gl. 2.5), schematisch dargestellt in Abb. 2.4.

$$\omega_+ = \frac{\omega_c}{2} + \sqrt{\left(\frac{\omega_c}{2}\right)^2 - \frac{\omega_z^2}{2}} \quad (2.3)$$

$$\omega_- = \frac{\omega_c}{2} - \sqrt{\left(\frac{\omega_c}{2}\right)^2 - \frac{\omega_z^2}{2}} \quad (2.4)$$

$$\omega_z = \sqrt{\frac{zV_{trap}\alpha}{ma^2}} \quad (2.5)$$

V_{trap} ist dabei das Potential, welches an den Endkappen angelegt wird, a eine charakteristische Fallendimension und α ein Parameter, der durch die Fallengeometrie festgelegt wird. Die Magnitude der Frequenzen folgt der Reihe $\omega_+ > \omega_z > \omega_-$ und erfüllt die Bedingung

$$\omega_+ = \omega_c - \omega_- \quad (2.6)$$

Die Magnetronbewegung ist weitestgehend unabhängig von m/z , ebenso die Reduktion der Zyklotronfrequenz.[34, 36] Für die Detektion der Ionen ist somit deren Zyklotronkreisbewegung entscheidend.

Die Detektion der Ionen erfolgt über Kondensatorplatten. Die Ionen, welche sich zwischen zwei Kondensatorplatten bewegen, induzieren in diesen eine Ladungsverschiebung. Die statistisch verteilten Ionen in der Zelle verursachen kein messbares Signal, da die Ladungen ausgeglichen sind. Zusätzlich sind die Ionen von den Platten zu weit entfernt, um messbare Signale zu verursachen. Die Anregung der Ionen kann durch das Anliegen eines oszillierenden Feldes, üblicherweise ein wechselndes Dipolfeld im Radiofrequenz-

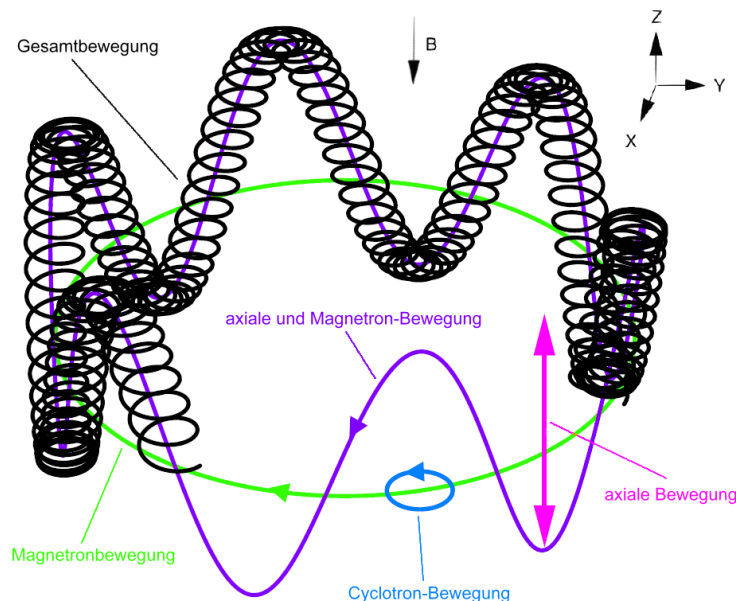


Abbildung 2.4: Bewegung eines Ions in einer ICR-Zelle, bei Anlegen des Trapping-Potentials. Zu sehen ist die Überlagerung der radialen Magnetronfrequenz, der reduzierten Zyklotronfrequenz und der Trappingfrequenz in z-Richtung (mit freundlicher Genehmigung von C. Freudenhammer[37]).

bereich (RF-Bereich), realisiert werden (Abb. 2.5 links). Eine Energieübertragung und Anregung tritt auf, wenn die Frequenz des Dipolfeldes mit der reduzierten Zyklotronfrequenz der Ionen übereinstimmt. Bei resonanten Bedingungen absorbieren die Ionen Energie, werden beschleunigt und vergrößern als Ionenpaket ihre Kreisbahn. Dabei werden weder die Zyklotronfrequenz noch die Ausdehnung der Ionen in der Zelle beeinflusst (Abb. 2.5 rechts). Durch das rotierende, kohärente Ionenpaket wird ein Wechselstrom zwischen den Detektorplatten induziert, dessen Amplitude proportional zur Anzahl der Ladungen ist. Durch die Fourier-Transformation können verschiedene Ionenpakete von unterschiedlichen Massen gleichzeitig detektiert werden.

Durch einen Anregungspuls können auch unerwünschte Ionen aus der Zelle entfernt und so die Isolation eines gewünschten m/z -Verhältnisses erreicht werden, ebenso kann die oben beschriebene Beschleunigung zur Fragmentierung mittels CID genutzt werden (siehe Abschn. 3.3.1). Neben der CID kann ein FT-ICR-MS auch mit weiteren Fragmentierungsmethoden wie der Electron Capture Dissociation (ECD) [38] oder Photo-dissoziationsmethoden (PD-Methoden) (siehe Abschn. 3.3.2) kombiniert werden. Unter diesen PD-Methoden hat insbesondere die IRMPD (siehe Abschn. 3.3.3) an Bedeutung

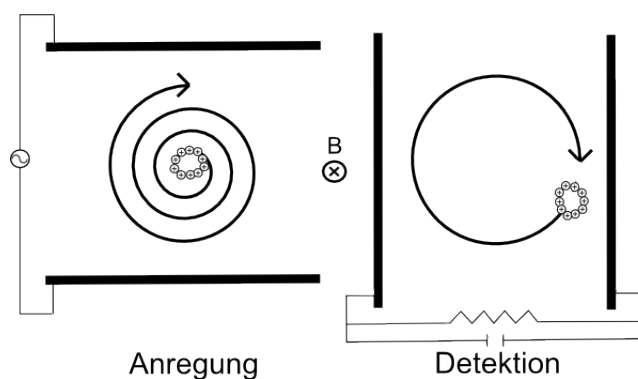


Abbildung 2.5: Schematische Anregung und Detektion der Ionen in der ICR-Zelle. Links: Anregung der Ionen zu einem kohärenten Ionen-Paket mit höherem Kreisradius; rechts: Detektion der ICR-Frequenz der Ionen.

gewonnen. Das FT-ICR-MS ist bislang eines der wenigen Geräte, das kommerziell mit einer PD-Fragmentierungsmethode erhältlich ist.

Zur Überführung der Analyte in die Gasphase können verschiedene Ionisationsquellen mit einem FT-ICR-MS gekoppelt werden. Zur Ionisation wurde in dieser Arbeit die ESI verwendet. Diese Kopplung des FT-ICR-MS mit der Elektrospray-Ionisation wurde bereits 1989 realisiert.[39]

2.2.2 Elektrospray-Ionisation

MALDI und ESI gehören aktuell zu den gebräuchlichsten Ionisationsmethoden für Oligosaccharide und Biopolymere.[40] Beide Methoden erlauben eine relativ sanfte Ionisation der Analyte, wobei bei der ESI meist weniger Oligosaccharidfragmente gebildet werden als bei der MALDI. Die ESI ist daher besser zur Untersuchung von fragilen Oligosacchariden, die z.B. Sulfonsäure- oder Neuraminsäuregruppen enthalten, geeignet.[31, 32] Jedoch besitzt diese Methode gegenüber der MALDI den Nachteil, dass die Ionisationseffizienz bei größeren Oligosacchariden abnimmt. Allgemein ist bei der konventionellen ESI die Ionisationseffizienz von Oligosacchariden geringer als bei Peptiden oder Proteinen.[41, 42] Dies führt zu weniger intensiven Signalen und wird meist durch Verwendung einer größeren Analytkonzentration kompensiert. Auch eine Derivatisierung der Analyte, mit der ihre Polarität herabgesetzt und die Flüchtigkeit erhöht wird, resultiert in verbesserten Signalintensitäten.[43] Bei der Verwendung der NanoESI, bei der die Größe der ESI-Tropfen reduziert wird, erhöht sich ebenfalls die Ionisationseffizienz und somit auch die Signalintensitäten der Saccharide im MS-Spektrum.[44] Hiermit werden vergleichbare Effizienzen erzielt wie bei Peptide und Proteine.[45]

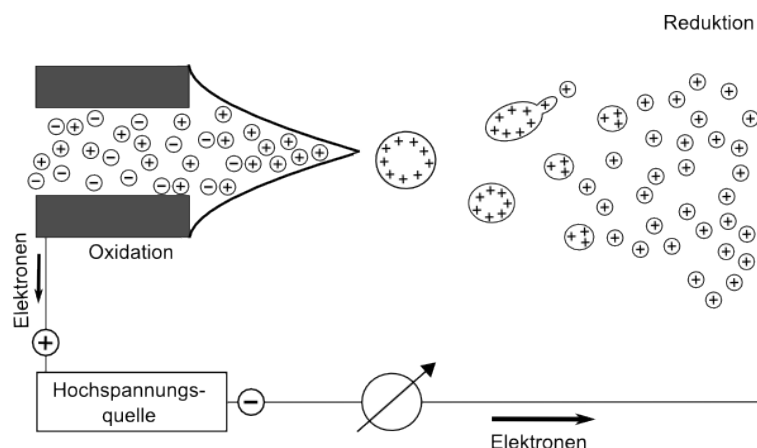


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des ESI-Prozesses.

Die Funktionsweise der konventionellen ESI soll kurz und schematisch dargestellt werden (Abb. 2.6).

Auf eine leitfähige Kapillare mit einem Innendurchmesser von ca. 100 μm wird ein Potentialunterschied von 3-4 kV relativ zur verwendeten Gegenelektrode angelegt. Je nach Ladungsunterschied werden Kationen oder Anionen erzeugt. Bedingt durch das angelegte Feld bewegen sich Ionen zur Kapillare oder werden von der Gegenelektrode angezogen. Durch diese Ladungstrennung wird bei Überschreitung einer kritischen Feldstärke an der Flüssigkeitsoberfläche eine Deformation des Meniskus hervorgerufen, der Taylor-Kegel genannt wird. Ausgehend von dem Taylor-Kegel entsteht ein feiner Strom von kleinen Tröpfchen, welche geladene Teilchen enthalten und von der Gegenelektrode angezogen werden. Ein neutrales Trägergas wird häufig verwendet, um die Vernebelung der Lösung und die Verdampfung des Lösungsmittels zu unterstützen. Die Tröpfchen verlieren neutrale Lösungsmittelmoleküle und zerfallen bei Unterschreitung des Rayleigh-Limits aufgrund der Coulomb-Abstoßung. Aus diesen Tröpfchen werden Ionen freigesetzt, welche durch Transferelemente in das Massenspektrometer geleitet werden.[46, 40]

Mit Hilfe der ESI können auch nicht-kovalente Komplexe in der Gasphase untersucht werden, u.a. Peptid-Metall- und Saccharid-Metall-Cluster.[47, 48] Üblicherweise werden mit positiver ESI die Quasimolekül-Ionen $[M+H]^+$ und mit negativer ESI die deprotonierten Spezies $[M-H]^-$ detektiert. Im positiven Ionenmodus werden aber auch Adduktionen mit Bestandteilen der ESI-Lösung oder der Matrix gebildet, wie z.B. $[M+Na]^+$ und $[M+NH_4]^+$. Der gebildete Ionentyp ist dabei von verschiedenen chemischen Eigenschaften der Analyte und der ESI-Lösung abhängig sowie von experimentellen Parametern, z.B. von der an der Kapillare und dem Sprayschirm angelegten Spannung und dem

Quellendruck.[49]

Bei underivatisierten Oligosacchariden werden bevorzugt Ionen der Spezies $[M+Na]^+$ gebildet. Schon eine geringe Natriumkonzentration, die in biologischen Proben gewöhnlich zu finden ist, verursacht intensive Adduktionensignale.[50, 51] Zur Bildung weiterer Metall-Adduktionen können die jeweiligen Salze dem ESI-Lösungsmittel zugesetzt werden. Dabei beeinflusst das Verhältnis von Oligosaccharid- zu Metallionenkonzentration die Bildung der verschiedenen Ionenspezies.[52, 53] Die Verwendung eines Methanol/Wasser-Gemisches als ESI-Lösungsmittel ist in der Saccharidanalytik weit verbreitet. Zur Verbesserung der Bildung protonierter Spezies kann die Lösung mit einer Säure oder NH_4^+ versetzt werden. Durch die Verwendung eines weniger polaren ESI-Lösungsmittels, z.B. einer Tetrachlorethan/Methanol-Mischung, kann die Bildung von Alkali-Adduktionen unterdrückt werden, so dass größtenteils die protonierten Spezies gebildet werden.[54] Bei der negativen ESI werden dem Lösungsmittel oft schwache Basen zugegeben, z.B. Natriumhydrogencarbonat.

Auch Cluster die mehrere Oligosaccharidmoleküle enthalten werden beobachtet.[54] So bildet Maltopentaose bei der Zugabe von NaCl die Spezies $[3M+2Na]^{2+}$, $[6M+4Na]^{4+}$, $[5M+3Na]^{3+}$, $[2M+Na]^+$ und $[7M+3Na]^{3+}$. Die Spezies des Vorläuferions besitzt einen signifikanten Effekt auf die Fragmentierungseigenschaften des Moleküls (siehe Abschn. 3.2).

3

Kapitel 3

Tandem-Massenspektrometrie von Oligosacchariden

Im Vergleich zu anderen Biopolymeren, wie Proteinen oder Peptiden, ist das Fragmentierungsverhalten von Sacchariden sehr komplex (siehe Abschn. 3.1). Das Fragmentierungsmuster variiert je nach Analyt, verwendeter Dissoziationsmethode (siehe Abschn. 3.3), verwendeter Ionenspezies (siehe Abschn. 3.2) und, falls eine Derivatisierung durchgeführt wurde, je nach Derivatisierungsart (Permethylierung, Peracetylierung, Derivatisierung am reduzierenden Ende).[31, 32]

Die am häufigsten angewendete Fragmentierungsmethode für Saccharide ist die CID (siehe Abschn. 3.3.1). Daneben werden auch die Collisionally Activated Dissociation (CAD) [55, 56] und elektronenbasierte Methoden, wie die Electron Capture Dissociation (ECD), Electron Detachment Dissoziation (EDD) und Electron Transfer Dissoziation (ETD) zur Strukturaufklärung von Oligosacchariden und Glycopeptiden verwendet [57, 58, 59]. Unter den Photodissoziationsmethoden hat insbesondere die Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (IRMPD) [11, 12] an Bedeutung gewonnen (siehe Abschn. 3.3.3), doch auch die Fragmentierung mittels Ultraviolett-Photodissoziation (UVPD) [16, 60] und Vakuum-Ultraviolett-Photodissoziation (VUVPD) [61, 62] findet Verwendung (siehe Abschn. 3.3.4).

3.1 Fragmentierungsmuster bei Oligosacchariden

Bei Oligosacchariden erfolgt die Fragmentierung entweder durch glycosidische Bindungsbrüche oder durch Ringbrüche. Bei einem glycosidischen Bindungsbruch wird eine der Bindungen des glycosidischen Sauerstoffs gebrochen. Die entstehenden Fragmente bie-

ten Informationen zur Sequenzfolge der Struktur. Ein Ringbruch stellt dagegen einen komplexeren Fragmentierungsweg dar, bei dem zwei Bindungen im Ring gebrochen werden.[63, 64] Die daraus entstehenden Fragmente bieten zusätzliche Informationen hinsichtlich der Konnektivität der Strukturen.[31, 32, 65]

Durch die Fragmentierung an zwei verschiedenen Seiten des Saccharids, z.B. am reduzierenden und am nicht-reduzierenden Ende, entstehen innere Fragmente. Auch die Eliminierung von inneren (nicht endständigen) Monosacchariden wird bei Oligosacchariden beobachtet. Einer solchen Eliminierung ist die Umlagerung einer Glycosylgruppe vorgeschaltet.[66, 67, 68]

Im Allgemeinen sind glycosidische Bindungsbrüche häufiger zu beobachten, dies gilt insbesondere bei niederenergetischen Fragmentierungsmethoden, wie der CID [69, 70] oder der IRMPD [12, 71, 72]. Bei hochenergetischen Anregungsmethoden, wie der CAD, werden vermehrt Ringbrüche beobachtet.[55, 56, 61]

Auch der Aufbau und die Struktur des Oligosaccharids, z.B. die chemischen Eigenschaften der Monomereinheiten und der Verzweigungsgrad, beeinflussen das Fragmentierungsverhalten.[31] Bei der CID weisen kleinere Saccharide eine größere Fragmentvielfalt auf, als größere Moleküle.[73] Einen deutlichen Effekt auf die Fragmentierung besitzt außerdem der Ionentyp des Vorläuferions. So werden bei protonierten Spezies seltener Ringbrüche beobachtet, wohingegen diese bei deprotonierten Spezies und Alkali-Adduktionen häufiger auftreten.[74, 13]

3.1.1 Nomenklatur der Fragmente nach Domon und Costello

Eine etablierte, systematische Nomenklatur der Fragmente, die von *Domon* und *Costello* entwickelt wurde, wird im Folgenden erklärt und ist in Abb. 3.1 und Abb. 3.2 grafisch dargestellt. Fragmente, die aus glycosidischen Bindungsbrüchen hervorgehen, werden als Y-, Z-, B- und C-Ionen bezeichnet. A und X-Typ-Ionen bezeichnen Ringbruchfragmente.

Ausgehend von dem nicht-reduzierenden Ende des Saccharids werden die Fragmente mit ${}^{k,l}A_i$, B_i und C_i gekennzeichnet, wobei i die glycosidische Bindung anzeigt, an welcher der Bindungsbruch erfolgt. Die Nummerierung geht von dem nicht-reduzierenden Ende aus und beginnt mit 1. Bei Ringbruchfragmenten geben k und l die Position im Ring an, an denen die Bindungsbrüche erfolgen. Ionen, die das reduzierende Ende des Saccharids enthalten, werden mit ${}^{k,l}X_j$, Y_j und Z_j bezeichnet. Die Nummerierung erfolgt hier ausgehend von dem reduzierenden Ende und beginnt mit 0.

Bei verzweigten Oligosacchariden wird die Saccharidstruktur in eine unverzweigte Kernstruktur und in Verzweigungen eingeteilt. Jede Verzweigung wird mit einem grie-

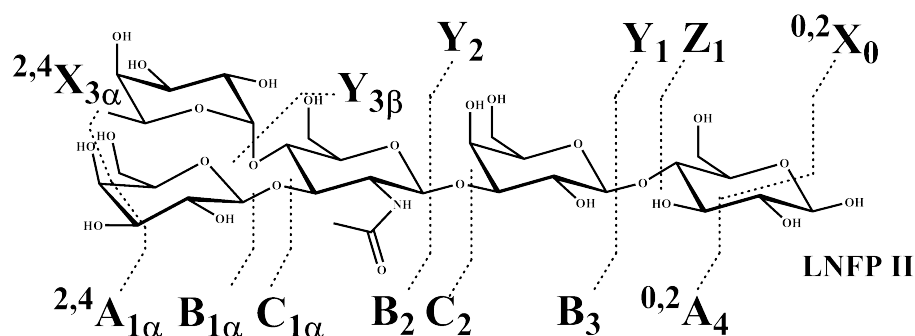


Abbildung 3.1: Nomenklatur der Oligosaccharidfragmente nach *Domon* und *Costello*.

chischen Buchstaben gekennzeichnet, wobei α die größte molekulare Masse besitzt ($\alpha > \beta > \gamma$ usw.). Fragmente, die an der α -Verzweigung auftreten, werden beispielsweise als ${}^{k,l}A_{i\alpha}$ - oder $B_{i\alpha}$ -Fragmente benannt. Aus der Kernstruktur gebildete Ionen werden ohne griechische Buchstaben bezeichnet, bei der Nummerierung der Bindungen wird jedoch die α -Verzweigung berücksichtigt.[63]

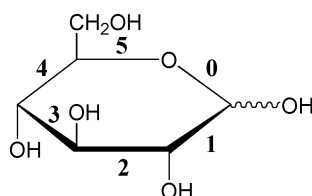


Abbildung 3.2: Nummerierung der Bindungen.

3.2 Fragmentierungsmuster verschiedener Ionenspezies und Umlagerungsreaktionen

Das entstehende Fragmentierungsmuster ist von der Ionenspezies des Vorläuferions abhängig. Die wesentlichen Merkmale des Fragmentierungsmusters der einzelnen Ionenspezies soll in diesem Abschnitt behandelt werden. Des Weiteren werden Umlagerungsreaktionen von Oligosacchariden beschrieben.

3.2.1 Protonierte Ionen

Die Fragmentierung von protonierten, underivatisierten Oligosacchariden findet bevorzugt durch glycosidische Bindungsbrüche statt, bei denen der glycosidische Sauerstoff am reduzierenden Ende des Saccharids bleibt.[32] Die entstehenden Fragmente sind Y- und

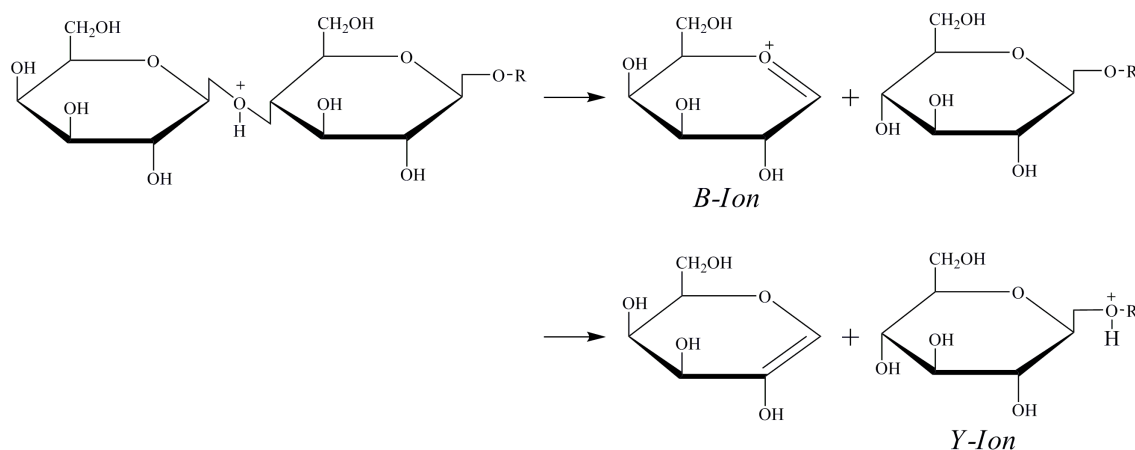


Abbildung 3.3: Bildung von B- und Y-Typ-Ionen bei protonierten Sacchariden.[63]

B-Typ-Ionen (Abb. 3.3).[63] Diese Zerfälle sind protoneninduziert [13, 63] und erfolgen schneller als die Fragmentierung von deprotonierten Ionen oder Alkali-Adduktionen.[74, 75, 76, 77]

Die CID von Gangliosiden resultieren z.B. in einer intensiven Serie von Y- und B-Fragmenten.[63] Dies weist darauf hin, dass die Protonen mobil sind und nicht lokalisiert vorliegen. Semiempirische Rechnungen (AM1) von protonierten Saccharidstrukturen deuten auch darauf hin, dass der glycosidische Sauerstoff nicht zwangsläufig die basischste Position der Struktur darstellt. Intramolekulare Wechselwirkungen der Hydroxygruppen beeinflussen die Protonenaffinität der unterschiedlichen Positionen, die untereinander nur geringfügige Unterschiede aufweisen.[77]

Auch die chemischen Eigenschaften der Saccharideinheiten besitzen einen Einfluss auf die Fragmentierung. *Dell et al.* zeigen, dass bei der FAB von permethylierten, protonierten Oligosacchariden Bindungsbrüche bevorzugt auf der reduzierenden Seite einer HexNAc-Einheit stattfinden.[78] Diese glycosidische Bindung wird durch ein Proton destabilisiert.

C- und Z-Typ-Ionen, die durch glycosidische Bindungsbrüche entstehen, bei dem der verbrückende Sauerstoff am nicht-reduzierenden Ende des Saccharids bleibt, werden bei protonierten Ionen seltener beobachtet. Bei der Bildung von Z-Typ-Ionen wird von einem zweistufigen Prozess ausgegangen, bei dem ausgehend von einem Y-Ion, Wasser abgespalten wird.[63]

Ringbrüche finden bei protonierten Sacchariden nur in geringem Ausmaß statt. Dabei werden grundsätzlich seltener A- und häufiger X-Typ-Ionen in den Spektren beobachtet.[31, 63, 79]

3.2.2 Adduktionen

Adduktionen können u.a. mit Alkali- und Erdalkaliionen gebildet werden. Grundsätzliche Unterschiede hinsichtlich des Fragmentierungsverhalten sollen bei den einfach und den zweifach geladenen Addukten betrachtet werden.

Monovalente Adduktionen:

Oligosaccharide haben die Eigenschaft mit Alkaliionen stabile Addukte zu bilden die massenspektrometrisch untersucht werden können. Dabei werden die Metallionen von Sauerstoffatomen des Oligosaccharids komplexiert.[13, 51] Die Bildung dieser stabilen Alkali-Adduktionen wird von der Größe der Metallionen und von der Anzahl und Position der Donorstruktur beeinflusst.[51, 80] Für Maltose und weitere lineare Oligosaccharide die auf Maltose basieren, wurde gezeigt, dass stabile Adduktionen eine Mindestanzahl an Monomereinheiten benötigen.[13] Li^+ und Na^+ koordinieren mit Disacchariden, wohingegen K^+ erst mit Triosen, Rb^+ mit Tetrosen und Cs^+ mit Pentosen stabile Komplexe bilden. Es wird davon ausgegangen, dass die Metalle in der Nähe eines glycosidischen Sauerstoffs koordinieren und von weiteren Sauerstoffatomen der Hydroxy-, Ether- oder Carbonylgruppen in Nachbarschaft komplexiert werden. Diese Annahme wird auch durch verschiedene semiempirische Rechnungen unterstützt.[51, 80, 81]

Die Wechselwirkung zwischen den Sauerstoffatomen und dem Metallion ist bei kleineren Ionen, wie Li^+ und Na^+ , stärker als bei größeren Ionen (K^+ , Rb^+ und Cs^+) und höhere Bildungswahrscheinlichkeiten sind für diese Komplexe zu erwarten.[77] Diese Tendenz konnte bei der ESI unter Verwendung verschiedener Kationen beobachtet werden.[49] Allerdings werden mit der MALDI auch abweichende Tendenzen beobachtet.[49, 82] *Mohr et al.* zeigen, dass die Signalintensitäten der Maltopentaose-Addukte mit fortlaufender Metallgröße zunehmen ($\text{H}^+ < \text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Cs}^+$).[82] Die Signalintensitäten sind von der inneren Energie der Ionen und somit auch von der Ionisationsart abhängig. Stark gebundene Ionen wie Li^+ verstärken die Sensitivität, wobei die Adduktionen jedoch eine stärkere Fragmentierung aufweisen. Cs^+ ist schwächer gebunden, doch die Adduktionen fragmentieren weniger intensiv.[51] Verschiedene Studien zeigen, dass Zerfälle von metastabilen Metalladdukten langsamere Zerfallsraten aufweisen als vergleichbare protonierte Spezies und dass die Raten unter diesen Ionen tendenziell mit der Reihenfolge ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$) abnehmen.[74, 75, 76, 77] Jedoch können die Zerfallsraten der Oligosaccharide auch von dieser Tendenz abweichen. Natrium-Addukte von α -Cyclodextrin weisen ähnliche Zerfallsraten auf wie die Kalium-Adduktionen.[77]

3 Tandem-Massenspektrometrie von Oligosacchariden

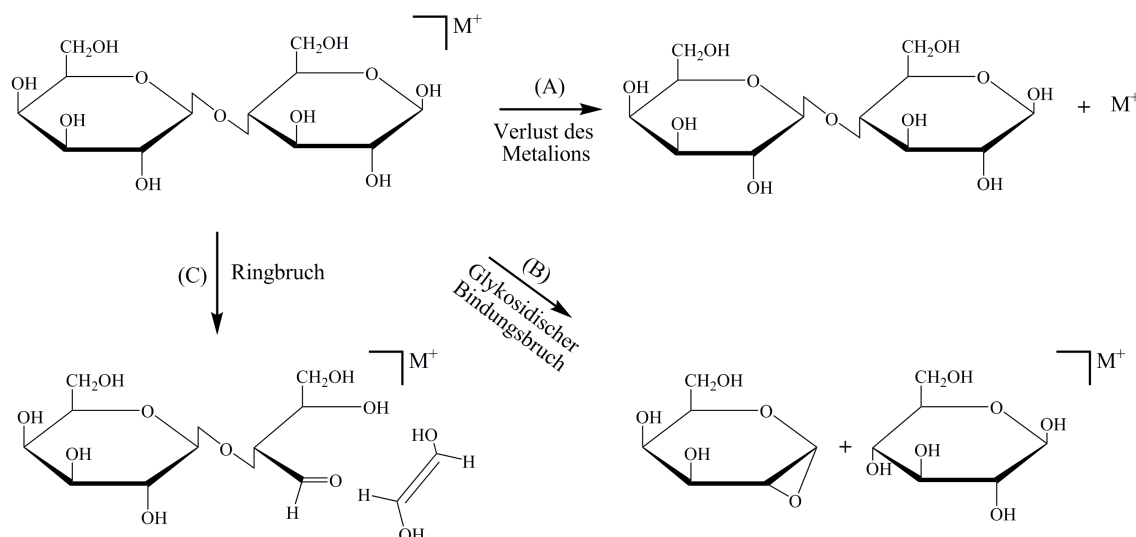


Abbildung 3.4: Fragmentierungswege von Alkali-Adduktionen: Verlust der Alkaliionen (A), glycosidische Bindungsbrüche (B) und Ringbrüche (C).[51]

Für Alkali-Adduktionen von unterivatisierten Oligosacchariden sind bei der CID drei verschiedene Fragmentierungswege möglich (Abb. 3.4). Der Verlust der Alkaliionen (A), glycosidische Bindungsbrüche (B) und Ringbrüche (C) können stattfinden. Bei letzteren verbleibt das Alkaliion an einem der entstehenden Fragmente.[51]

Der Verlust des Alkaliions ist für größere Ionen wahrscheinlicher als für kleine Metallionen. Bei der CID fragmentieren Cs- und Rb-Adduktionen fast ausschließlich auf diesem Weg, anders als Li- und Na-Adduktionen, die diese Art der Fragmentierung seltener aufweisen.[49, 51] Dabei spielt wieder die Größe und Komplexierungsfähigkeit des Saccharids eine entscheidende Rolle. K-Adduktionen von Disacchariden zeigen ausschließlich den Verlust des Metallions [51], wohingegen größere Saccharide zusätzlich durch glycosidische Bindungsbrüche oder Ringbrüche fragmentieren. In den Fragmentspektren der K-Adduktionen sind gewöhnlich nur wenige unterschiedliche Fragmente mit einem geringen Anteil an Ringbrüche zu beobachten.[49, 51, 80] Li⁺- und Na⁺-Addukte verursachen fragmentreichere Spektren und sind somit besser zur Strukturaufklärung von Oligosacchariden geeignet als die größeren Metalle.[31, 80] Sie weisen in den MS/MS-Spektren auch eine größere Anzahl an Ringbruchfragmenten auf als die protonierten Strukturen.[49, 56, 74, 78]

Experimente von *Asam et al.*, die mit ¹⁸O gelabelten Disacchariden durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass die Fragmentierungswege von Li- und Na-Adduktionen ähnlich sind.[80] Li-Adduktionen verursachen jedoch unter vergleichbaren Bedingungen

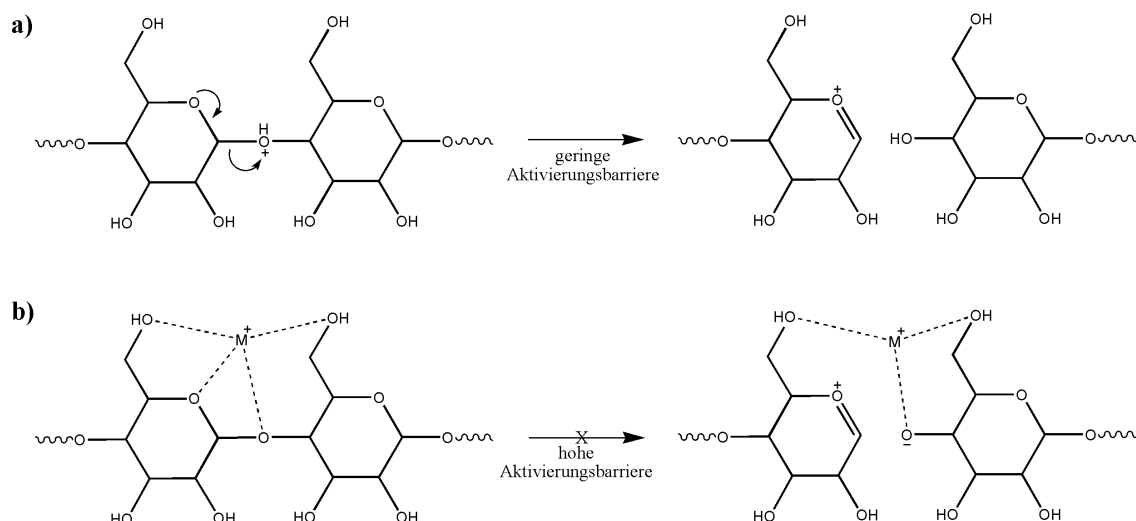


Abbildung 3.5: Fragmentierung von (a) protonierten glycosidischen Bindungen und (b) Alkali-Adduktionen.[13]

intensivere Fragmente.[80, 13, 77] Trotzdem werden MS/MS-Experimente üblicherweise mit Na^+ -Addukten durchgeführt, da schon die Natriumkontaminationen in der ESI-Lösung ausreichen, um intensive Adduktionen zu erhalten. Die Zugabe von Alkalisalzen ist dabei nicht erforderlich.[80]

Cancilla et al. zeigen, dass die Aktivierungsbarriere von glycosidische Bindungsbrüchen mit der Kationengröße korreliert.[51] Im Gegensatz zu den Protonen, die im wesentlichen an ein Sauerstoffatom koordinieren, werden Metallionen von mehreren Sauerstoffatomen komplexiert (Abb. 3.5b). Dadurch wird die glycosidischen Bindung stabilisiert.[13]

Die Fragmentierung von protonierten Oligosacchariden und kleinen Metallionen wie Li^+ erfolgt überwiegend ladungsinduziert, wohingegen angenommen wird, dass die Fragmentierung bei größeren Metalladdukten überwiegend charge-remote (ladungsfern) erfolgt.[13, 51, 81, 83, 84] Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, dass Ionen (z.B. Li^+) an den Bindungsbrüchen beteiligt sind.[81] Eine charge-remote-Fragmentierung erfordert grundsätzlich mehr Energie als eine ladungsinduzierte Fragmentierung.[13] Des Weiteren sind kleine Ionen wie Li^+ und Na^+ mobiler und nur an zwei Ringen koordiniert.[13, 49]

Ringbrüche scheinen von der Größe des Alkaliaddukts unabhängig zu sein, werden aber durch die Konnektivität der Oligosaccharide beeinflusst.[13, 51] Dies ist konsistent mit der Annahme, dass es sich bei Ringbrüchen, z.B. bei der Bildung von $^{0,2}\text{A}_2$ -Fragmentationen, um einen zweistufigen Prozess handelt, bei dem zuerst eine Ringöffnung stattfindet, gefolgt von einer retro-Aldol-Reaktion (Abb. 3.6).[81, 83]

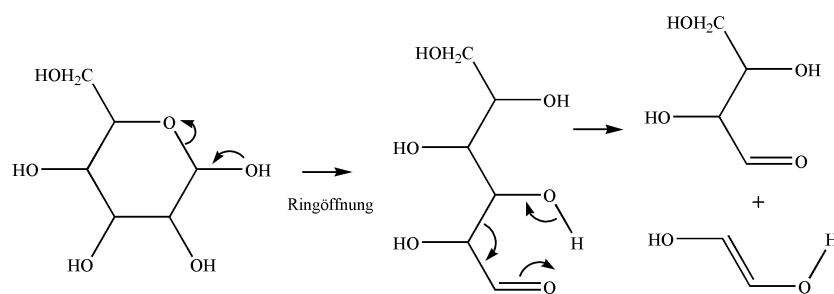


Abbildung 3.6: Bildungmechanismus von $^{0,2}\text{A}$ -Typ-Ionen.[13]

Divalente Adduktionen

Erdalkali- und Übergangsmetalle wurden ebenfalls als Addukte bei der ESI eingesetzt. Dazu gehören Calcium- und Magnesiumionen [31, 52, 53, 85], Kupferionen [53, 85, 86, 87], Kobaltionen [53, 85, 87, 88], Manganionen [53, 85, 87], Zinkionen [53], Blei- und Cadmiumionen [85]. Bei linearen Oligosacchariden wurden mittels ESI hauptsächlich die Spezies $[\text{M}+\text{Me}]^{2+}$, $[\text{M}+\text{Me}-\text{H}]^+$ oder $[\text{M}+\text{MeX}]^+$ gebildet (Me = divalentes Metall, X = Gegenion, z.B. Cl^-).[53, 85]

Die Fragmentierung der verschiedenen Aggregate ändert sich je nach Oligosaccharid und verwendeter Spezies. *Leary et al.* zeigen, dass Cu^{2+} - und Zn^{2+} -koordinierte Trimere und Pentamere bei der CID nur wenige strukturelevante Fragmente aufweisen. Die Ca^{2+} -, Co^{2+} - und Mn^{2+} -koordinierten Trimere weisen viele Gemeinsamkeiten in den MS/MS-Spektren auf, wohingegen die verschiedenen Pentamere, besonders die Co^{2+} -koordinierten Spezies, sich im Fragmentierungsverhalten unterscheiden.[53] Die Fragmentierung der Spezies $[\text{M}+\text{Me}]^{2+}$ führt zu einfach und zweifach geladenen Fragmenten.[53, 87] Die Fragmente werden dabei hauptsächlich durch glycosidische Bindungsbrüche oder Ringbrüche am reduzierenden Ende ($^{0,2}\text{A}$ und $^{2,4}\text{A}$) gebildet.[87]

3.2.3 Deprotonierte Ionen

Der Großteil der massenspektrometrischen Literatur zur Fragmentierung von Oligosacchariden behandelt Kationen, doch auch anionische Oligosaccharide werden massenspektrometrisch untersucht und resultieren in Fragmentspektren, die ergänzende Informationen und teilweise sehr spezifische Fragmente bieten.[89] Anionische Oligosaccharide werden durch Deprotonierung der Analyte oder durch anionische Addukte gebildet. Die Bildung dieser Adduktionen geschieht u.a. mit Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} und CH_3COO^- . [89, 90, 91] Besonders saure Oligosaccharide, wie Saccharide mit N-Acetylneuraminsäure

3.2 Fragmentierungsmuster und Umlagerungsreaktionen

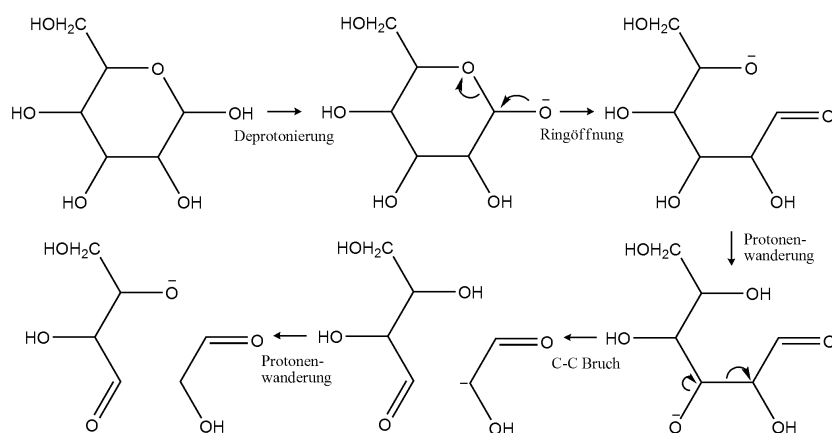


Abbildung 3.7: Bildungsmechanismus von $^{0,2}A$ -Typ-Ionen bei deprotonierten Sacchariden.[64]

(Neu5Ac)-Gruppen werden mit negativer ESI untersucht, da sie gute Ionisationseffizienzen besitzen.[31, 90]

Die Fragmentierungsreaktionen anionischer Oligosaccharide weisen niedrigere Zerfallsraten auf als die protonierten Saccharide oder Alkali-Adduktionen.[77] Die Saccharide fragmentieren sowohl durch glycosidische Bindungsbrüche, als auch durch Ringbrüche. X-Fragmente werden in den Fragmentspektren nur selten, A-Typ-Ionen jedoch häufiger beobachtet. Diese A-Fragmente bieten Strukturinformationen über die Konnektivität der Ringe.[63, 64, 90, 92] Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass Ringbrüche charge-remote stattfinden, sie werden jedoch bei deprotonierten Analyten durch die Ladung erleichtert (Abb. 3.7).[51, 64]

Verbleibt bei einem glycosidischen Bindungsbruch der glycosidische Sauerstoff am nicht-reduzierenden Ende des Saccharids, werden C- oder auch Z-Typ-Ionen gebildet.[63] Verbleibt der Sauerstoff am reduzierenden Ende des Saccharids, werden Y- und B-Typ-Ionen beobachtet (Abb. 3.8).[63, 93] Bei glycosidischen Bindungsbrüchen findet eine Protonenwanderung über Hydroxygruppen statt.[81] Bei underivatisierten Oligosacchariden treten deshalb glycosidische Bindungsbrüche häufiger auf als bei den vergleichbaren permethylierten Substanzen, bei denen weniger freie Hydroxygruppen zur Verfügung stehen. Bei diesen Strukturen finden wiederum häufiger Ringbrüche statt.[55]

Bei der CID von einfach geladenen, underivatisierten Sacchariden werden die Fragmentspektren durch C- und A-Fragmente dominiert.[89, 94, 95] Auch bei verschiedenen Oligosacchariden aus Muttermilch wurde bevorzugt konsekutive C-Typ-Fragmentierung der $[M-H]^-$ -Spezies beobachtet. Bei unverzweigten Strukturen werden keine inneren Fragmente beobachtet.[94, 95] Bei der CID von verzweigten Spezies werden C- und Z-Fragmente

3 Tandem-Massenspektrometrie von Oligosacchariden

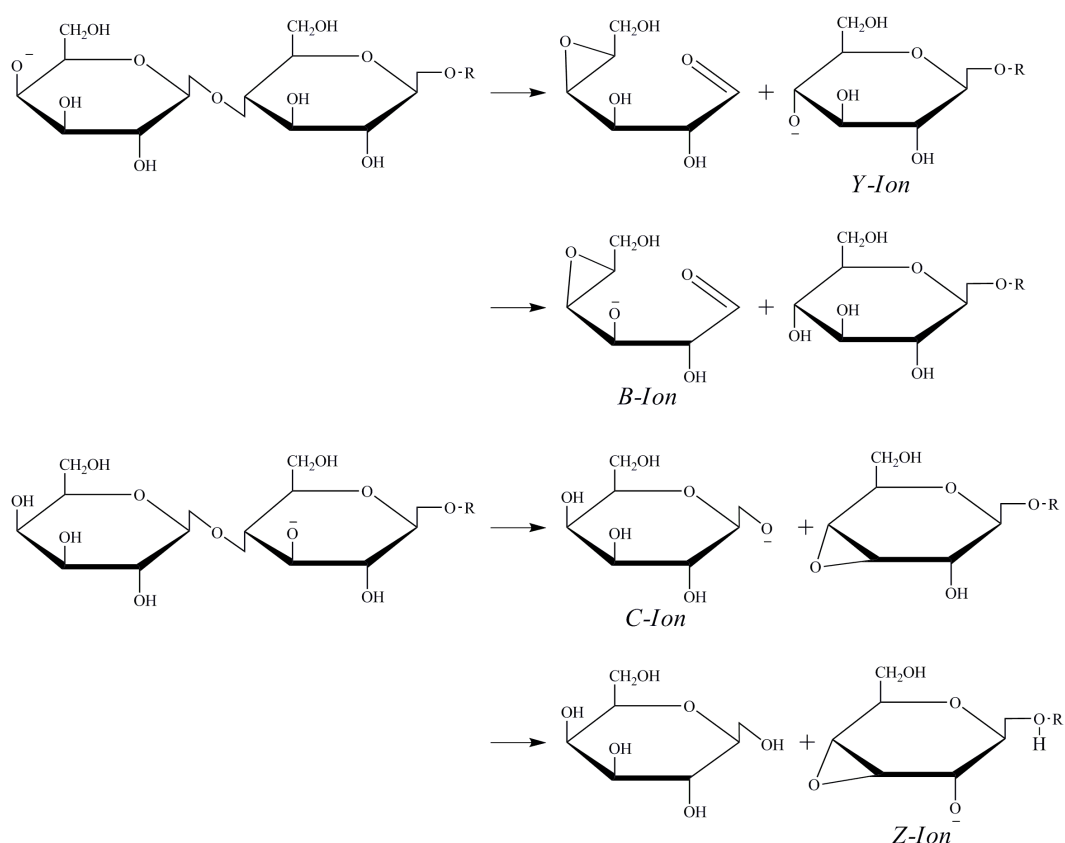


Abbildung 3.8: Glycosidische Bindungsbrüche bei deprotonierten Sacchariden.[63]

beobachtet, wobei die Z-Typ-Fragmentierung am verzweigenden Saccharidring stattfindet. Anders als bei den positiven Ionen besitzen die Anionen eine große Stabilität bezüglich des Verlustes einer Fucose. Dies wurde auch bei anderen Strukturen, z.B. N-Glycanen, beobachtet.[89, 90, 91]

3.2.4 Umlagerungen

Wie bei protonierten Peptiden werden bei protonierten Oligosacchariden auch Fragmente beobachtet, die auf Umlagerungsreaktionen zurückzuführen sind.[66, 67, 68] Intensiv untersucht wurde in diesem Zusammenhang der Verlust von inneren Saccharidanteilen bei Oligosacchariden, die am reduzierenden Ende durch reduktive Aminierung derivatisiert wurden.[96, 97, 98, 99]

Von *Lebrilla et al.* wurden in diesem Zusammenhang bei den derivatisierten Oligosacchariden aus Muttermilch, Lacto-N-difucohexaose I (LNDFHI) und LNFP I, die Migration von Fucose untersucht (Abb. 3.9). Diese Fucoseumlagerung tritt bei protonierten

3.2 Fragmentierungsmuster und Umlagerungsreaktionen

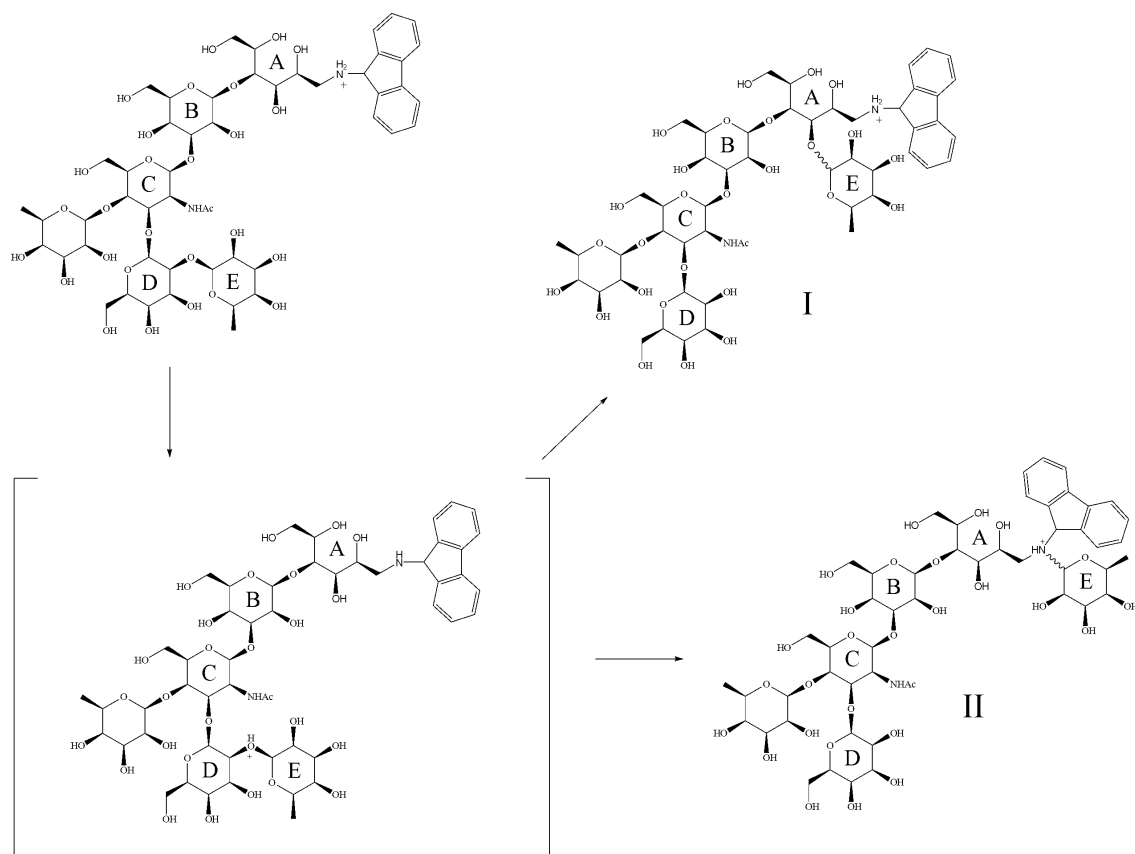


Abbildung 3.9: Umlagerung von Fucose bei Lacto-N-difucohexaose I.[96]

Molekülen ($[M+H]^+$), aber nicht bei Natrium-Adduktionen ($[M+Na]^+$) auf.[68, 96, 99] Mögliche Mechanismen sind unter anderem in [96, 99, 100] beschrieben und beinhalten die induzierende Protonierung am Stickstoffatom des Labels. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass unterivatisierte Oligosaccharide seltener und weniger intensiv diese Umlagerungen zeigen und die Signalintensitäten der Indikatorfragmente mit größerer Basenstärke des Amin-Labels zunehmen.[99]

MS³ Experimente, die von *Lebrilla et al.* beschrieben werden, deuten darauf hin, dass die Umlagerung zu einer Hydroxygruppe an dem Endterminus des Oligosaccharids stattfindet, der durch die reduzierte Aminierung geöffnet ist (Abb. 3.9 I).[96] Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass eine N-Methylierung der Aminogruppe keinen offensichtlichen Einfluss auf die Fucosewanderung besitzt. Eine weitere Möglichkeit ist eine Umlagerung zur Aminogruppe (Abb. 3.9 II).

3.3 Fragmentierungsmethoden

3.3.1 Collision-Induced Dissociation (CID)

Die Collision-Induced Dissociation ist eine Fragmentierungsmethode, bei der die kinetische Energie von Molekülonen durch ein elektrisches Potential erhöht wird. Dabei kollidieren die Ionen mit einem neutralen Stoßgas. Als Stoßgas wird meist Stickstoff, Helium oder Argon verwendet. Die kinetische Energie der Moleküle wird bei mehrfachen Stößen (ca. 10 bis 100) so lange in innere Energie umgewandelt, bis eine kritische Energie erreicht wird und das Molekül dissoziiert. Die dadurch entstehenden Fragmentionen können massenspektrometrisch untersucht werden.[9]

Die CID ist auch in Ionenfallenexperimenten, wie dem FT-ICR-MS, die am häufigsten verwendete Fragmentierungsmethode.[9, 101] Sie findet in der ICR-Zelle statt, kann bei einigen Instrumenten aber auch in einer vorgelagerten Stoßzelle realisiert werden. Die Fragmentierung in der ICR-Zelle kann m/z -selektiv durchgeführt werden und auch mehrstufige Fragmentierungsprozesse (MS^n) sind möglich. Die kinetische Energie der Ionen wird dazu durch resonante Anregung der Zyklotronfrequenz erhöht (Abb. 2.5). Die Ionen gelangen auf eine höhere Kreisbahn und kollidieren mit einem meist gepulst eingespeisten Stoßgas. Da die Massengenauigkeit eines FT-ICR-MS mit wachsendem Druck in der Zelle abnimmt, wird die darauf folgende Detektion in einem zeitlichen Abstand durchgeführt. Während dieser Zeit wird das Stoßgas abgepumpt. Neben der Störung des Hochvakuums in der ICR-Zelle weist die Kombination von CID und FT-ICR-MS noch weitere Nachteile auf. So ist die Aufnahme der kinetischen Energie der Molekülonen bei einem gegebenen Magnetfeld durch die Abmessung der ICR-Zelle beschränkt (Gl. 3.1) und wird durch das RF-trapping Potential beeinflusst. Die Fragmentionen werden zudem in einer höheren Kreisbahn gebildet, was sich negativ auf die weitere Detektion oder Fragmentierung auswirkt.[9, 34, 101]

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv_{x,y}^2 = \frac{z^2 B_0^2 r^2}{2m} \quad (3.1)$$

Auch in der Saccharidanalytik ist die CID die am häufigsten eingesetzte Fragmentierungsmethode. In den meisten Fällen werden im positiven Ionenmodus die Natrium-Adduktionen der Oligosaccharide als Vorgängerionen verwendet. Wie schon in Abschn. 3.1 und 3.2 beschrieben wurde, dominieren bei der CID von unmodifizierten Oligosacchariden die glycosidischen Bindungsbrüche. Ringbruchfragmente sind meistens nur mit geringer Intensität zu beobachten. Die Fragmentierungseffizienz sinkt mit der Größe

der Strukturen. Auch der Anteil an Ringbruchfragmenten nimmt bei größeren Oligosacchariden ab.[70] Aufgrund der hohen Komplexität der Saccharide ist eine Stukturaufklärung mit einer einstufigen Fragmentierung meistens nicht möglich und der Einsatz von MSⁿ-Methoden oder die Verwendung von Glycosidasen ist erforderlich, um weitere Strukturinformationen zu gewinnen.[69]

3.3.2 Photodissoziationsmethoden (PD)

Bedingt durch die Nachteile der CID und die Tatsache, dass eine Lasereinstrahlung oftmals apparativ einfacher zu verwirklichen ist als das Einpulsen eines Stoßgases, hat das Interesse an Photodissoziationsmethoden zugenommen.[9, 102]

Bei der Photodissoziation wird die innere Energie der Molekülionen durch Absorption von Photonen so lange erhöht, bis diese fragmentieren. Entscheidend für die Fragmentierung ist hierbei die Energie der Photonen, die Einstrahlzeit und der Absorptionsquerschnitt der Ionen bei den verwendeten Wellenlängen.

Für die Durchführung von PD-Experimenten werden Laser verwendet. Eine Übersicht der häufig verwendeten Wellenlängen mit zugehörigen Energien pro Photon findet sich in Abb. 3.10. Je nach verwendeter Laserwellenlänge werden unterschiedlich viele Photonen zum Erreichen der Dissoziationsschwelle benötigt. Bei der VUVPD (ca. 6-10 eV/Photon) handelt es sich meistens um Einphotonenprozesse, wohingegen bei der UV- und VisPD (ca. 2-6 eV/Photon) wenige Photonen und bei der IRMPD (ca. 0,1 eV/Photon) sogar bis zu mehreren hundert Photonen zum Erreichen der Dissoziationsschwelle erforderlich sind.[102]

PD-Experimente mit Biomolekülen wurden mit Ionenfallen-MS [16, 60, 62, 103, 104, 105, 106, 107], mit FT-ICR-MS [12, 72, 108, 109] aber auch mit Flugzeitmassenspektrometern [110, 111, 112] (TOF) durchgeführt.

Dabei begrenzt die verwendete Laserwellenlänge die Wahl des MS. VUV- und UVPD sind mit einem Flugzeitmassenspektrometer kompatibel, da eine Einstrahlzeit von we-

VUVPD	UVPD	Vis-PD	IRMPD
157 nm 7,9 eV	355 nm 3,5 eV	457-514 nm 2,7-2,4 eV	10,6 µm 0,1 eV

Abbildung 3.10: Laserwellenlängen, die zur Fragmentierung von Sacchariden verwendet wurden, mit zugehörigen Energien (eV) pro Photon.

nigen Mikrosekunden zur Photofragmentierung genügt.[113, 114, 115]

Ionenfallen, wie das FT-ICR-MS, erlauben eine längere Einstrahlzeit des Lasers von Millisekunden bis zu Sekunden, was auch die Durchführung langwelliger PD-Experimente, wie die VisPD oder die IRMPD, erlaubt.

Bei der Durchführung der PD ist eine ausreichende Absorption der zu untersuchenden Analyte in dem verwendeten Bereich des elektromagnetischen Spektrums erforderlich. Dies ist für underivatisierte Oligosaccharide nur bei VUV- und IR-Licht gegeben.[61, 72, 104] Für die Anregung dieser Biomoleküle mit Photonen im UV/Vis-Bereich ist eine vorherige Derivatisierung mit einem Chromophor (Label) nötig.[15, 16, 60]

3.3.3 Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (IRMPD)

Die IRMPD ist eine Fragmentierungsmethode, die häufig Anwendung in Ionenfallenexperimenten findet.[116] Bei der IRMPD wird dabei zur Ionenanregung ein sogenannter Continuous Wave- (cw) oder quasi-cw-IR-Laser mit geringer Leistung im (quasi-) kontinuierlichen Betrieb verwendet. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um einen CO₂-Laser, der 9,6 μm und 10,6 μm (0,13 eV/Photon und 0,12 eV/Photon) emittiert. Diese Fragmentierungsmethode ist bei der Strukturaufklärung von Biomolekülen weit verbreitet.[102, 116] In Kombination mit einer Quadrupol-Ionenfalle besitzt die IRMPD allerdings den Nachteil, dass unter den höheren Druckbedingungen die Stoßkühlung eine größere Rolle spielt und der Fragmentierung entgegenwirkt.[117, 118]

Die Kombination der IRMPD mit dem FT-ICR-MS ist einfach zu realisieren. Der IR-Laser wird direkt durch ein wellenlängendurchlässiges Fenster (z.B. CaF₂) in die ICR-Zelle eingestrahlt. Ein Vorteil dieser Fragmentierungsmethode gegenüber der CID ist, dass die Ionen nicht in höhere Kreisbahnen angeregt werden. Die Fragmente entstehen am Einstrahlort, idealerweise in der z-Achse der Zelle. Außerdem ist kein Stoßgas notwendig, welches den Druck erhöht und damit die Auflösung des MS verschlechtert.

Die IRMPD ist, ebenso wie die CID, eine niederenergetische, schwingungsanregende Methode. Im Allgemeinen führt sie zu relativ ähnlichen Fragmentierungswegen. Sie besitzt jedoch den Vorteil, dass nicht nur die meisten Biomoleküle, sondern auch deren Fragmente eine Absorption bei 10,6 μm aufweisen. Die Vorläuferionen dissoziieren, wobei auch die Produkte weiter fragmentiert werden. Dies kann zu einer größeren Fragmentenvielfalt führen und ersetzt teilweise MSⁿ-Methoden.[102, 116]

Auch zur Strukturaufklärung von Oligosacchariden und Glycopeptiden wird diese Fragmentierungsmethode eingesetzt.[10, 11, 12, 13, 14] Sie weist besonders bei großen Saccharidstrukturen Unterschiede zur CID auf. Bei der IRMPD von N-glycosidisch ge-

bundenen Glycoproteinen findet die Fragmentierung am Glycan statt und nicht am Peptidteil.[119] Bei verschiedenen N- und O-glycosidisch gebundenen Oligosacchariden wird eine intensivere Fragmentierung beobachtet als mit der CID. Dazu gehört auch eine größere Anzahl an Ringbruchfragmenten.[10, 14, 120] IRMPD wird auch zur Fragmentierung von sulfatierten Oligosacchariden verwendet. Bei diesen tritt eine stärkere Eliminierung der SO_3 -Gruppen auf als bei der CID.[121]

Bei der Fragmentierung von Alkali-Adduktionen verschiedener Oligosaccharide verläuft die Fragmentierung je nach Metall unterschiedlich. Dies wurde von *Xie et al.* bereits für die Oligosaccharide LNFP I und LNFP II gezeigt.[12] Bei den größeren Metallionen K^+ , Rb^+ und Cs^+ verläuft die Reaktion häufiger durch den Verlust des Metallions als bei Li^+ und Na^+ . Dies kann in der größeren Variation der Anregungsenergie der Stöße begründet sein. Bei den kleineren Metall-Adduktionen (Li^+ und Na^+) von LNFP I und LNFP II wurden nur sehr geringe Unterschiede zwischen den beiden Anregungsmethoden beobachtet.

Pikulski et al. zeigen, dass durch chromophore Gruppen, die kovalent [117] oder komplex gebunden sind [118], die IR-Absorption der Analyte verbessert wird. Zur Verbesserung der IR-Absorption der LNFP-Serie wurde hierfür ein IR-aktives Boronsäurederivat (IRABA) verwendet. Dies führt neben einer Verbesserung der IR-Absorption auch zu einem vereinfachten Fragmentspektrum. Die Fragmentierung des Derivates findet von der nicht-reduzierenden Seite des Saccharids statt.[118]

3.3.4 Vakuumultraviolett-Photodissoziation (VUVPD) und Ultraviolett-Photodissoziation (UVPD)

Das Interesse an der Vakuumultraviolett-Photodissoziation (VUVPD) und der Ultraviolett-Photodissoziation (UVPD) von unterschiedlichen Biomolekülen hat in den letzten Jahren zugenommen.[62, 102, 106, 110, 122, 123, 124] Die PD von Oligosacchariden wurde dabei bei unterschiedlichen Wellenlängen zwischen 157 nm (7,9 eV/Photon) und 355 nm (3,5 eV/Photon) durchgeführt.

Durch die hohe Energie der Photonen können auch gepulste Laser mit hoher Leistung verwendet werden, da kurze Einstrahlzeiten ausreichen, um die Analyte zu fragmentieren. Die VUVPD bei 157 nm wurde mit einem F_2 -Eximer-Laser sowohl in einem "TOF-TOF-MS" wie auch in einer Linearen-Ionenfalle (LTQ) realisiert. Als Analyte dienten dazu unterschiedliche Glycane [61, 104, 125] und auch Glycopeptide [104, 110]. Diese Anregungsmethode verursacht die Fragmentierung der Vorläuferionen und auch der

Fragmente und die resultierenden Sekundärionen bieten weitere Strukturinformationen. Als Vorläuferionen wurden die Natrium-Adduktionen von underivatisierten oder permethylierten Oligosacchariden verwendet. Die PD-Fragmentspektren ähneln qualitativ den CAD-Spektren der jeweiligen Substanzen.[61, 104, 125] Neben glycosidischen Bindungsbrüchen finden in hohem Ausmaß auch Ringbrüche statt.[104, 125] In den PD-Spektren der Maltopentaose wird z.B. eine starke $^{1,5}\text{X}$ - und eine weniger intensive $^{2,4}\text{A}$ - und $^{3,5}\text{A}$ -Typ-Serie beobachtet.[61]

Maltohexaose wurde mittels Aminoguanidin und Girards T-Reagenz derivatisiert und mit VUV-Licht fragmentiert.[61] Dabei wies die protonierte Spezies des Aminoguanidin-Derivates Fragmente von dem reduzierenden Ende des Saccharids auf. Dazu gehörten intensive $^{1,5}\text{X}$ -, Z- und Y-Fragmente.

Bei einer Wellenlänge von 157 nm wurden in einem LTQ die Natrium-Adduktionen isomerer Trisaccharide, wie Melzitose und Raffinose, bestrahlt.[105] Eine Unterscheidung dieser Isomere war anhand von isomerenspezifischen Fragmenten möglich.[105, 106]

Das PD-Verhalten von deprotonierten Oligosacchariden wurde von *Ko et. al.* untersucht.[126] Die Fragmentierung wurde bei einer Wellenlänge von 193 nm in einer linearen Ionenfalle durchgeführt. Die UVPD-Spektren der einfach deprotonierten Neu5Ac-haltigen Oligosaccharide weisen ein informativeres Fragmentierungsmuster mit einem großen Anteil an Ringbrüchen auf. Dieses Muster beinhaltet eine intensive A-Typ-Fragmentierung und eine X-Typ-Fragmentierung sowie innere Ionen des Typs A/Y und X/B. Oligosaccharide, die zwei N-Acetylneuraminsäuregruppen enthalten, bilden bei negativer ESI zweifach deprotonierte Ionen. Während bei der CID zweifach geladene Fragmenten gebildet werden, sind bei UV-Einstrahlung nur einfach geladene Fragmente zu beobachten, da eine N-Acetylneuraminsäure unter UV-Einstrahlung eliminiert wird. Eine große Anzahl an A/Y- und A/Z-Typ-Ionen gehören hierbei zu dem charakteristischen Fragmentierungsmuster.[126]

Deprotonierte, sulfatierte Disaccharide wurden in einer LTQ mit einem OPO-Laser bestrahlt.[103] Dabei wurden Wellenlängen zwischen 220 nm und 290 nm verwendet. Die maximale Absorption und Fragmentierung einfach geladener Disaccharide ohne Sulfatsäuregruppen lag bei 228 nm, mit Sulfatsäuregruppen bei 240 nm.[127] Die Disaccharide fragmentierten bei der UVPD ähnlich wie bei der CID. Die PD-Spektren wiesen jedoch noch zusätzliche A- und X-Ringbruchfragmente auf. Dagegen wurde die Eliminierung von Neutralen, z.B. H_2O , seltener beobachtet als in den CID-Spektren. Zweifach deprotonierte Saccharide wurden mit 220 nm fragmentiert. Hierbei wurden ähnliche MS/MS-Spektren erhalten wie mit der CID.

Mit einer Wellenlänge von 355 nm wurden verschiedene Oligosaccharide in einer LTQ fragmentiert. Da Oligosaccharide bei dieser Wellenlänge keine Absorption aufweisen, wurden Chromophore verwendet und durch reduktive Aminierung [16] oder durch Hydrazid-Kopplung [60] an die Saccharide gekoppelt. Als Vorläuferionen wurden die Natrium-Adduktionen der Derivate verwendet. Diese fragmentieren von dem reduzierenden Ende des Saccharids und die Fragmente weisen eine Eliminierung des Labels auf. Es bilden sich A- und C-Typ-Ionen, die das nicht-reduzierende Ende des Saccharids beinhalten sowie innere Ionen (A/Y). Auch die verwendete Kopplungsmethode beeinflusst die Fragmentierung. Bei reduktiver Aminierung werden $^{0,1}\text{A-}$ und $^{0,2}\text{A-}$ -Fragmente gebildet, wohingegen bei Hydrazidderivaten $^{2,4}\text{A-}$ und $^{0,2}\text{A-}$ -Fragmente überwiegen.

3.3.5 Photodissoziation im sichtbaren Spektralbereich (VisPD)

Die Verwendung von sichtbarem Licht zur Detektion von derivatisierten Sacchariden ist weit verbreitet.[18] Nach chromatographischer oder elektrophoretischer Trennung wird die Absorption von sichtbarem Licht oder die Fluoreszenz verwendet, um Saccharide qualitativ oder auch quantitativ nachzuweisen.[43]

Enjalbert et al. [15] zeigen, dass eine Fragmentierung von derivatisierten Sacchariden mittels visuellem Licht prinzipiell möglich ist. Die PD-Experimente wurden bei 560 nm mit einem gepulsten Laser in einer linearen Ionenfalle durchgeführt. Als Chromophor wurden 2-Oxo-3-pyrrolin-Derivate verwendet. Diese besitzt eine lokalisierte negative Ladung und wurde an 6-Acido-6-deoxy-Saccharose und 6-Acido-6-deoxy-Glucose gekoppelt. Aufgrund der negativen Ladung des Chromophors wurde die ESI im negativen Ionenmodus verwendet. Die PD-Massenspektren weisen nur Y_1 -Fragmente auf, welche durch einen glycosidischen Bindungsbruch gebildet werden. Des Weiteren werden drei Fragmente beobachtet, welche auf Ringbrüche zurückzuführen sind. Diese Fragmente besitzen jedoch nur sehr geringe Intensitäten von unter 5 %.

3.4 Derivatisierung von Oligosacchariden

Chromatographie, Elektrophorese und Massenspektrometrie sind die Basismethoden der Saccharidanalytik.[18, 128] Allerdings ist die Mehrheit der untersuchten Saccharide hydrophil, neutral und nicht flüchtig. Sie sind nicht UV-aktiv und besitzen bei der ESI eine mäßige Ionisationseffizienz.[129] Aus diesem Grund ist bei der Saccharidanalytik oftmals

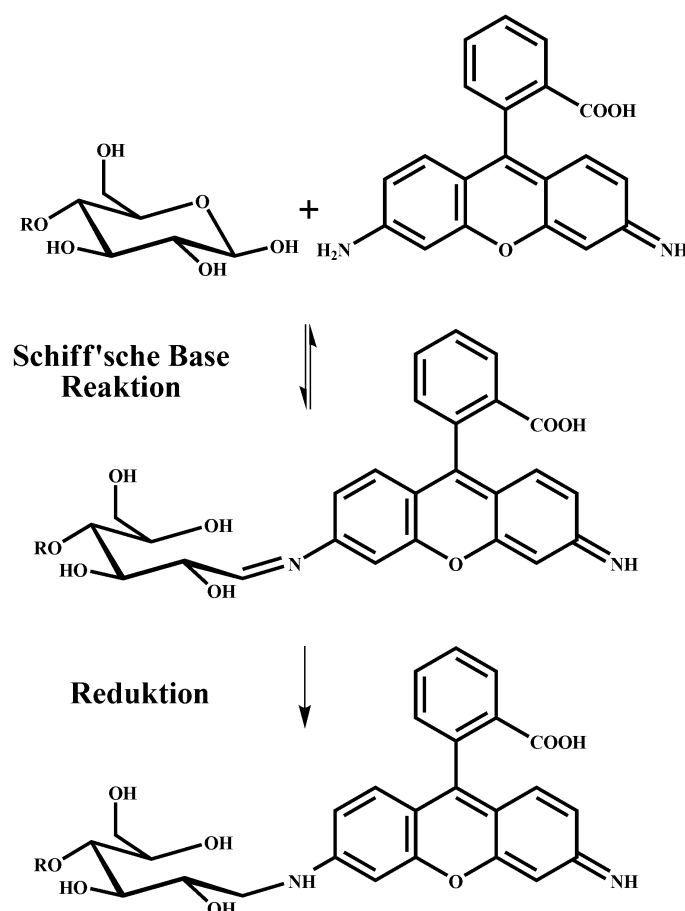


Abbildung 3.11: Reduktive Aminierung eines Saccharids mit Rhodamin 110.

ein Derivatisierungsschritt erforderlich.[130, 43] Je nach Methode werden lipophile, geladene oder chromophore Gruppen als Derivate verwendet.[18, 131] In der Gasphasenanalytik, wie z.B. der Gaschromatographie, werden lipophile Derivatisierungsmittel zur Verbesserung der thermischen Stabilität und Erhöhung der Flüchtigkeit eingesetzt.[132] Zur Verbesserung der chromatographischen und elektrophoretischen Trennung werden lipophile und geladenen Gruppen verwendet.[133, 134, 135] In der Massenspektrometrie werden Derivatisierungsmittel eingesetzt, um die Ionisierbarkeit der Saccharide zu verbessern, um ihr Fragmentierungsverhalten zu ändern oder um das Fragmentspektrum zu vereinfachen.[129, 136]

Fluoreszenzmarker und UV-aktive Gruppen werden auch zur optischen Detektion verwendet.[137, 134, 138] Optisch aktive Gruppen erlauben zusätzlich die Durchführung von PD-Methoden [15, 16, 60] oder verbessern das Fragmentierungsverhalten bei der IRMPD.[117]

Zahlreiche Derivatisierungsmittel und -methoden sind für Saccharide bekannt.[18, 43, 131] Die reduktive Aminierung am reduzierenden Ende des Saccharids mit einem primären Amin ist die am häufigsten verwendete Methode, die einfach und mit hoher Ausbeute durchzuführen ist (Abb. 3.11). Dabei wird als Zwischenstufe eine Schiff'sche Base gebildet, welche im zweiten Schritt zu einem sekundären Amin reduziert wird.[43, 131, 139]

Kapitel 4

Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden werden im Folgenden aufgeführt.

4.1 Das Massenspektrometer

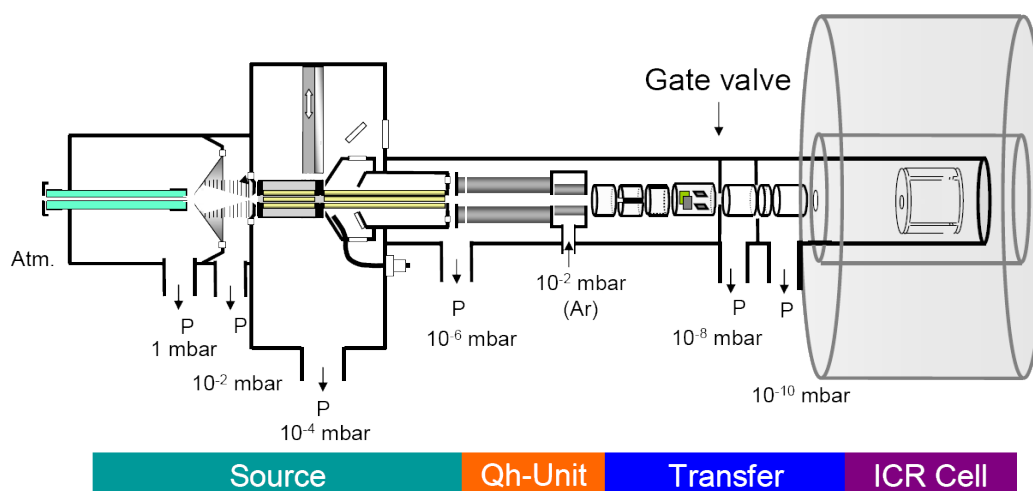


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau des FT-ICR-MS mit Combi Quelle und ApexQe.

Alle Experimente wurden an einem APEXQe FT-ICR-MS durchgeführt (Bruker Daltonics). Das System wurde mit der Software ApexControl 2.0 angesteuert. Abbildung 4.1 zeigt einen schematischen Aufbau des Experiments. Es beinhaltet einen 9,4 T Cryomagneteten (11 cm Bohrung), eine Apollo II Combi Quelle, einen Quellenhexapol (storage hexapole), eine Quadrupol-Einheit (Qh-Unit) mit einem massenselektiven Quadru-

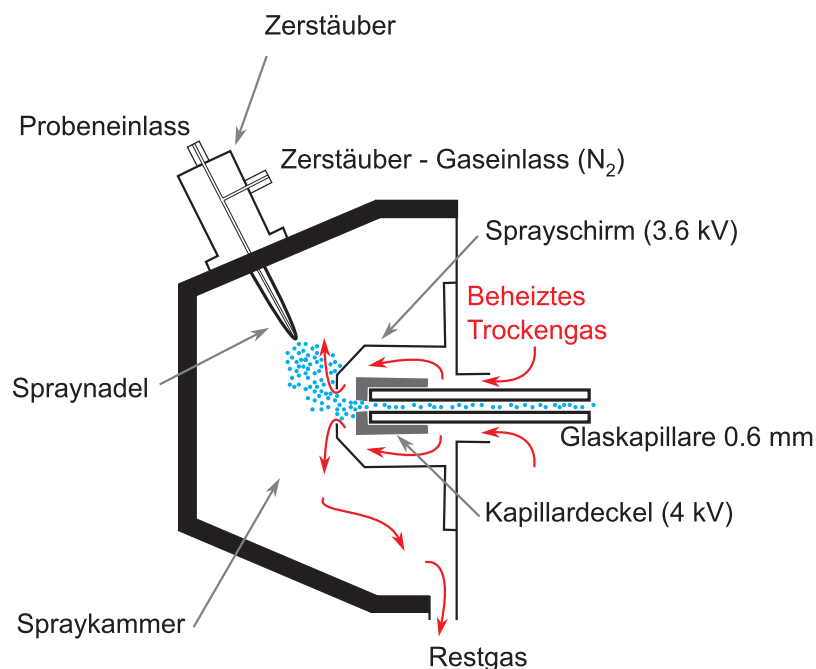


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau der Spraykammer (mit freundlicher Genehmigung von C. Freudenhammer[37]).

pol und einer Hexapol-Stoßzelle, eine Transfer-Einheit und eine 6 cm lange zylindrische InfinityTM-Zelle mit 6 cm Durchmesser. Mit zwei Vorpumpen und vier Turbopumpen werden sieben unterschiedliche Vakuumbereiche von 1 mbar bis zu einem Ultrahochvakuum (UHV) von 10^{-10} mbar aufrecht erhalten.

Ionisation: Die Elektrospray-Ionisation der Analyte erfolgte mit der Apollo II Combi Quelle (ESI/MALDI), die in Abb. 4.2 schematisch dargestellt ist. Der gelöste Analyt wird mittels einer Spritzenpumpe (120 $\mu\text{l/h}$) in das System injiziert, wobei Stickstoff als Zerstäuber gas verwendet wird. In der Spraykammer wird Stickstoff als beheiztes Trockengas (240 °C) verwendet. Die Ionen gelangen durch eine Glaskapillare und einen Skimmer in den Funnel und werden durch Hochfrequenz- und Gleichspannungen, sowie einen weiteren Skimmer fokussiert. Während des ESI-Prozesses werden, je nach verwendetem Ionisationsmodus, Spannungen angelegt. Im positiven ESI-Modus betrug die Kapillarspannung 4500 V und bei negativer ESI zwischen 3700 V und 4000 V. Die Ionen gelangen weiter durch einen mobilen Hexapol in einen Quellenhexapol, in dem die Ionen stoßgekühlt und akkumuliert werden. Anschließend gelangen sie in ein massenselektives Quadrupol.

Isolation: Die Isolation konnte im massenselektiven Quadrupol und/oder in der ICR-Zelle durchgeführt werden. Bei der Laseranregung wurde die Isolation durch das Quadrupol bevorzugt.

Fragmentierung:

Als Fragmentierungsmethoden wurden IRMPD, VisPD und CID verwendet. Die experimentellen Parameter sind im Folgenden aufgeführt.

Laseranregung: Allgemein vereinfacht die Verwendung eines cw- oder quasi-cw-Lasers das experimentelle Setup in Bezug auf die zeitliche Abstimmung zwischen MS und Laser. Die Laser werden durch ein CaF₂-Fenster in die ICR-Zelle eingekoppelt. Die Laser-PD findet in der ICR-Zelle statt.

IRMPD: Die IRMPD-Experimente wurden mit einem CO₂-Laser (J48-5, Synrad, Mukilteo, USA, $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$, maximale Leistung 50 W) durchgeführt. Die Laserleistung wurde zwischen 20 % und 90 % der maximalen Leistung variiert. Bei der Messung der Stabilität der verschiedenen Cluster wurde eine Pulslänge von 0,1 s gewählt.

VisPD: Die VisPD Experimente wurden mit einem Argon-Ionen-Laser Innova 70c (Coherent, Santa Paula) durchgeführt. Der Laser wurde im Multiline- oder Singleline-Modus betrieben. Das Linienspektrum mit zugehöriger maximaler Leistung ist in Tab. 4.1 zusammengestellt. Für die VisPD-Experimente der Derivate wurden Laserleistungen zwischen 0,2 W und 2 W gewählt.

CID: Die Fragmentierung kann in der Stoßzelle mit erhöhtem Argon-Druck oder in der Zelle mit Argon als Pulsgas stattfinden. Die CID-Experimente wurden fast ausschließlich in der ICR-Zelle durchgeführt. Die Anregungsenergien und Zeiten wurden, je nach Masse und Stabilität der Ionen, angepasst.

Tabelle 4.1: Wellenlängen des Innova 70c mit maximal verfügbarer Leistung.

Wellenlänge / nm	Leistung / W
514,5	2,2
501,7	0,5
496,5	0,8
488,0	2,0
476,5	0,8
472,7	0,2
465,8	0,2
457,9	0,4
454,5	0,2
Multiline	ca. 6

Das Fragmentierungsverhalten der Derivate ist in Abschn. A beschrieben. Die Fragmentierung der positiv geladenen Rhodamin 110-Derivate und der 2-Aminoazotoluol-Derivate wurde im Multiline-Modus und im Singleline-Modus mit 488 nm oder 514 nm durchgeführt. Die PD-Experimente der Propidiumiodid-Derivate wurden bei 514 nm durchgeführt. Die Proflavin-Derivate wurden im Multiline-Modus fragmentiert. Bei der VisPD von 6-Aminoquinolin-Derivaten und des Clusters $[\text{LNFPII}+\text{AMQ}+\text{H}]^+$ wurde die Anregungswellenlänge 457,9 nm gewählt. Im negativen Ionenmodus fand die Fragmentierung der Rhodamin-Derivate und 2-Aminoazotoluol-Derivate bei 488 nm statt.

Kalibrierung: Das Massenspektrometer wurde mit Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH), Angiotensin oder LNFPII kalibriert. Eine externe Kalibrierung der Massenspektren wurde mit der Software DataAnalysis durchgeführt.

4.2 Material

Die Oligosaccharide Lacto-N-fucopentaose II (LNFPII) und LS-Tetrasaccharid c (LSTc) wurden von Mobitec (Göttingen, Deutschland) und Maltopentaose von Sigma-Aldrich gekauft. Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) wurde von Mobitec und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die organischen Lösungsmittel (MS grade) wurden von Fluka (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. DMSO wurde vor Verwendung über einem Molekularsieb getrocknet. Aqua dest. wurde mit Purelab Ultra gereinigt (Elga LabWater, Celle, Deutschland), Aqua bidest. wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Die Festphasenextraktion (SPE) wurde mit den Oasis HLB Kartuschen (6 cc, 30 mg HLB) der Firma Waters (Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Die Gase Argon (5.0) und Stickstoff wurden von Messer Griesheim (Krefeld, Deutschland) und Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Der Farbstoff Rhodamin 110 wurde von Lambda Physik, (Göttingen, Deutschland), 6-Aminoquinoline und Proflavin von Sigma-Aldrich, Propidiumiodid und 2-Aminoazotoluol von ABCR (Karlsruhe, Deutschland) gekauft. Alle Salze, dazu gehören Lithiumchlorid, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Rubidiumbromid, Magnesiumsulphat, Calciumchlorid, Strontiumchlorid, Ammoniumhydrogencarbonat und Ammoniumchlorid wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

4.3 Probenvorbereitung

Underivatisierte Oligosaccharide: LNFP I, LNFPII, Maltopentaose und LSTc wurden in Konzentrationen von 2-100 μM in $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v), in purem Wasser oder

in MeOH:H₂O:HCOOH (49,9:49,9:0,2 v/v/v) gelöst. Im negativen Ionenmodus wurden 10 µM Oligosaccharide in 0,1 M NH₄HCO₃ in MeOH:H₂O (1:1 v/v) gelöst. Zur Darstellung der Adduktionen wurden im positiven Ionenmodus LiCl, NaCl, KCl, RbBr, SrCl₂, BaCl₂ und NH₄Cl im Überschuss zugegeben (10 µM - 100 µM). MeOH:H₂O:HCOOH (49,9:49,9:0,2 v/v/v), mit 10 µM NH₄Cl wurde zur Darstellung der protonierten Spezies verwendet.

Derivatisierte Oligosaccharide: Die Derivatisierung der Oligosaccharide ist in Abschn. A.1 beschrieben. Zur Erzeugung der protonierten Spezies $[M+H]^+$ wurde ein Gemisch aus MeOH:H₂O:HCOOH (49,9:49,9:0,2 v/v/v) als ESI-Lösungsmittel verwendet. Zur Darstellung der Alkali-Adduktionen wurde LiCl, NaCl oder KCl zugegeben (100 µM). Im negativen Ionenmodus wurde, zur Darstellung der deprotonierten Spezies, 0,1 M NH₄HCO₃ in MeOH:H₂O (1:1 v/v) als ESI-Lösungsmittel verwendet. Die Oligosaccharid-Farbstoffcluster wurden in Wasser vermessen. Zur Bildung der LNFP II und Rh110-Cluster wurden 5 µM LNFP II und 5 µM Rh110 zugesetzt, zur Bildung des Clusters $[LNFP II + AMQ + H]^+$ wurden 20 µM LNFP II und 50 µM AMQ in H₂O verwendet.

4.4 Auswertung, Benennung und Beschriftung der Moleküle und Fragmente

Die Zuordnung der Fragmente erfolgte mit Hilfe der Auswertesoftware DataAnalysis 3.4 (DA), ChemDraw Ultra 10.0 und der Datenbank SweetDatabase[140]. Die Nomenklatur der Fragmente erfolgte nach *Domon* und *Costello* (siehe Abschn. 3.1.1). In vielen Fällen ist die Zuordnung eines Signals zu mehreren isomeren Fragmenten möglich. Ein Beispiel dafür sind die Fragmente B₃/Y₄ (LNFP I) und B₂/Y_{3β} (LNFP II). Sie besitzen die gleichen Massen wie die Fragmente B₄/Y₃ (LNFP I) und B₃/Y_{3α/3β} (LNFP II). Die Bildung der ersten genannten Fragmenten wird aufgrund der destabilisierten glycosidischen Bindung am reduzierenden Ende der GlcNAc als wahrscheinlicher angenommen. Dafür spricht auch die geringe Intensität der Y₄- (LNFP I) und Y_{3α}-Fragmente (LNFP II) in den Spektren der unterivatisierten Spezies und ihr Fehlen in den Spektren der derivatisierten Oligosacchariden. Trotzdem können diese Signale nicht eindeutig identifiziert werden. Um eine überschaubare Zuordnung der Fragmente in den Spektren zu gewährleisten, werden die Signale nur mit der wahrscheinlichsten Zuordnung gelabelt. Des Weiteren werden in den Spektren keine Nachkommastellen angegeben.

Die Fragmente gehören, wenn nicht anders beschrieben, zu der gleichen Ionenspezies

wie ihre Vorläuferionen. Die protonierten Ionen werden als $[M+H]^+$ -Ionen, deprotonierte als $[M-H]^-$ -Ionen abgekürzt, wobei M für das Oligosaccharidmolekül steht. Für Adduktionen wird die Schreibweise $[M+xMe]^{+/2+}$ und $[M+H+Me]^{2+}$ gewählt, wobei x die Anzahl der Adduktionen darstellt und Me für das Alkali- oder Erdalkalimetall steht. Derivatisierte Ionenspezies (hier Molekül-Farbstoff: M-FS) werden als $[M-FS+H]^+$ beschriftet, wobei die deprotonierten Ionen als $[M-FS-H]^-$ abgekürzt werden. Cluster, die aus mehreren Oligosacchariden bestehen, werden mit $[xM+H+Me]^{2+}$ oder $[xM+2Me]^{2+}$ abgekürzt und als dimere oder trimere Cluster beschrieben. Die Fragmente, die Saccharidanteile aus zwei Oligosacchariden besitzen, werden als Dimerfragmente beschrieben.

5 Kapitel 5 VisPD und CID der protonierten Oligosaccharide

5.1 VisPD und CID der Maltopentaose-Derivate

Maltopentaose (MP, Abb. 5.1), ein unverzweigtes Pentasaccharid aus Glucoseeinheiten, wurde zunächst als Testsubstanz verwendet und mittels reduktiver Aminierung mit verschiedenen Chromophoren derivatisiert, die unter Vis-Einstrahlung fragmentieren. Angaben zur Auswahl der chromophoren Gruppen, Derivatisierung, Aufreinigung und Absorption der Derivate befinden sich in Anhang A.

Als Chromophore wurden Propidiumiodid, Proflavin, 2-Aminoazotoluol und Rhodamin 110 (Tab. A.1) eingesetzt. Die unterschiedlichen Derivate wurden im positiven Ionenmodus ionisiert, die einfach protonierten Spezies wurden isoliert und mittels VisPD untersucht. Eine Ausnahme stellte das PI-Derivat dar, welches zwei lokalisierte positive Ladungen besitzt und als zweiwertiges Kation untersucht wurde. Die 2AT- und Rh110-Derivate wurden zusätzlich mit der CID analysiert.

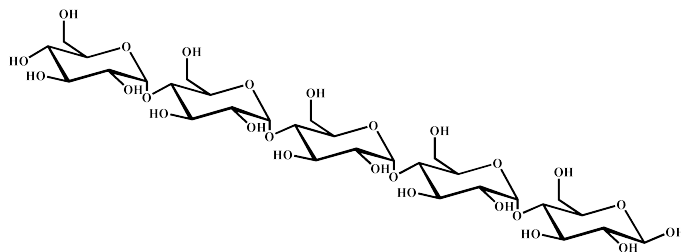


Abbildung 5.1: Maltopentaose

5.1.1 VisPD von Maltopentaose-Proflavin (MP-PF) und Maltopentaose-Propidiumiodid (MP-PI)

Die protonierte Spezies $[\text{MP-PF}+\text{H}]^+$ und das zweifach geladene Ion $[\text{MP-PI}]^{2+}$ wurden mittels VisPD fragmentiert.

Das VisPD-Spektrum von $[\text{MP-PF}+\text{H}]^+$ (m/z 1022,4) weist nur Fragmentensignale von geringer Intensität (max. 15 %) auf (Abb. 5.2). Bei den Fragmenten handelt es sich überwiegend um Farbstofffragmente, die keinen Saccharidanteil besitzen (m/z 100 bis m/z 300). Die Fragmente mit Saccharidanteil, welche Informationen über das Oligosaccharid bieten, sind das Y_1 -Fragment (m/z 374,2) und das Z_1 -Fragment (m/z 356,2) (Abb. 5.3, oben). Diese weisen Signalintensitäten unter 2 % auf.

In den VisPD-Spektren von $[\text{MP-PI}]^{2+}$ (m/z 613,3) sind mehrere zweifach geladene Signale zu erkennen, aber auch einfach geladene Fragmentationen werden gebildet (Abb. 5.4). Die zweifach geladenen Signale besitzen Intensitäten unter 15 % und können der Y-Typ-Fragmentserie zugeordnet werden: Y_1^{2+} (m/z 289,2), Y_2^{2+} (m/z 370,2), Y_3^{2+} (m/z 451,2) und Y_4^{2+} (m/z 532,3) (Abb. 5.3, unten).

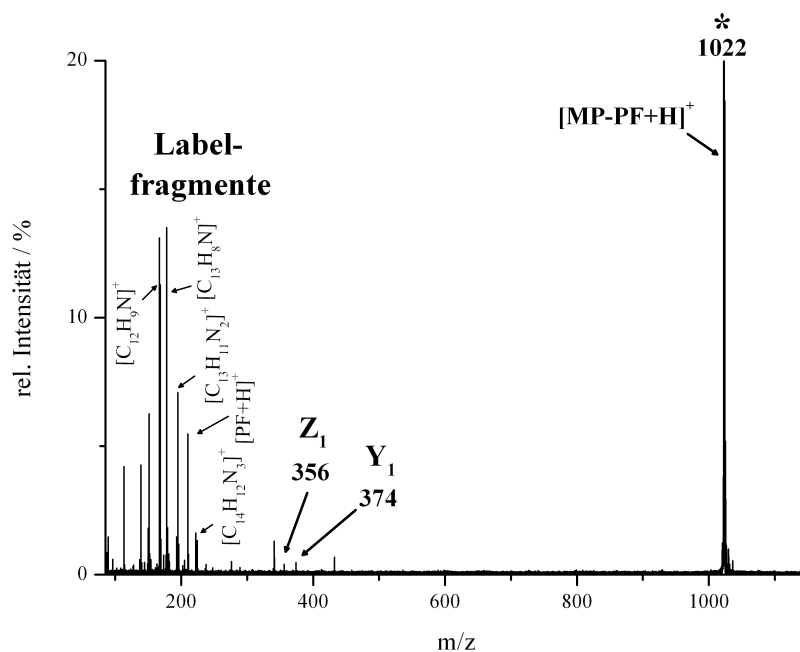


Abbildung 5.2: VisPD-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-Proflavin}+\text{H}]^+$ (m/z 1022,4).

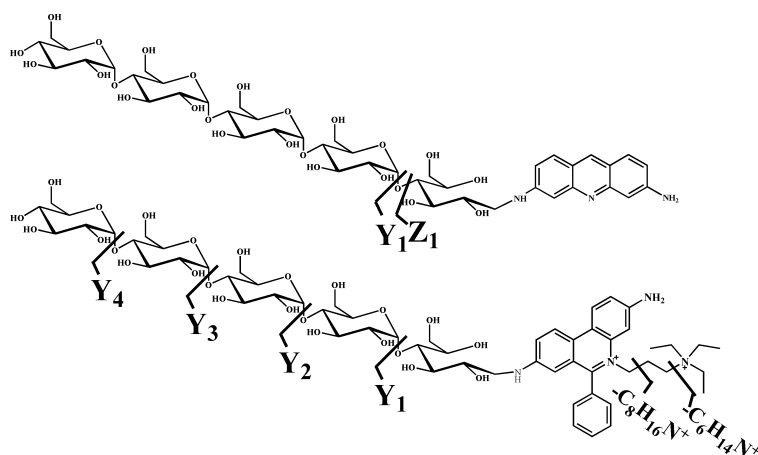


Abbildung 5.3: Fragmente mit Saccharidanteil von (oben) $[\text{MP-PF}+\text{H}]^+$ und (unten) $[\text{MP-PI}]^{2+}$ bei der VisPD.

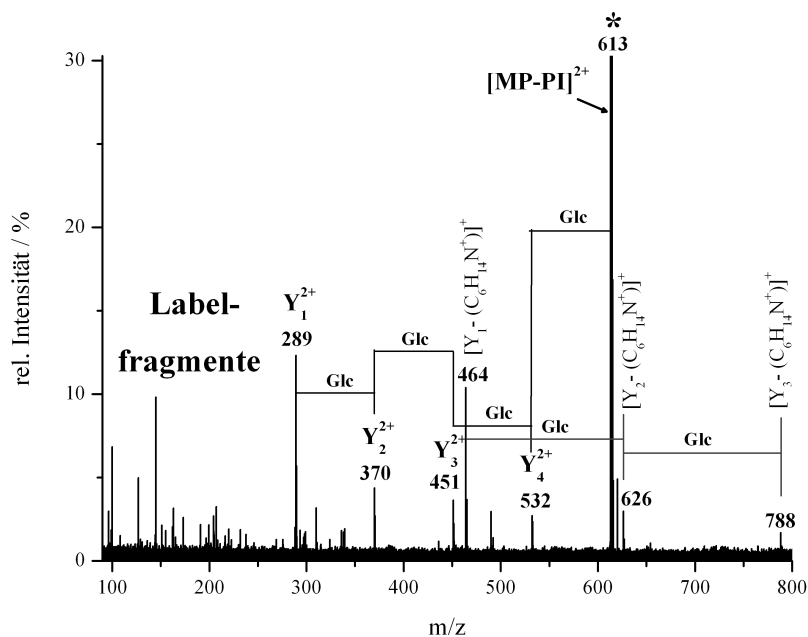


Abbildung 5.4: VisPD-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-Propidiumiodid}]^{2+}$ (m/z 613,3).

Einfach geladene Fragmente können durch glycosidische Bindungsbrüche und gleichzeitige Eliminierung von $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}^+$ an dem Farbstoff gebildet werden. Zu diesen Fragmenten, die mit geringer Intensität gebildet werden (max. 10 %), gehören die Y-Typ-Ionen Y_1^+ (m/z 464,2), Y_2^+ (m/z 626,3) und Y_3^+ (m/z 788,3). Das Fragment bei m/z 490,2

kann durch Y_1 -Fragmentierung und gleichzeitige Eliminierung von $C_8H_{18}N^+$ gebildet werden. Unter Verwendung von PI als Label ist eine stärkere Fragmentierung des Saccharidanteils zu beobachten als bei PF. Aufgrund der Instabilität des Farbstoffs unter Vis-Einstrahlung und die dadurch resultierenden einfach geladenen Fragmente wird die Interpretation des Spektrums jedoch erschwert.

5.1.2 VisPD und CID von Maltopentaose-2-Aminoazotoluol (MP-2AT) und Maltopentaose-Rhodamin 110 (MP-Rh110)

Die protonierten Derivate $[MP-2AT+H]^+$ und $[MP-Rh110+H]^+$ wurden mittels VisPD und CID fragmentiert.

Die Spezies $[MP-2AT+H]^+$ (m/z 1038,4) fragmentiert unter Vis-Einstrahlung schon bei geringer Laserintensität (0,2 W, 488 nm) (Abb. 5.5). Die Signale zwischen m/z 180 und m/z 300 können Farbstofffragmenten zugeordnet werden, die keine Saccharidanteile mehr beinhalten. Nur wenige Saccharidfragmente sind im Spektrum zu erkennen (Abb. 5.6).

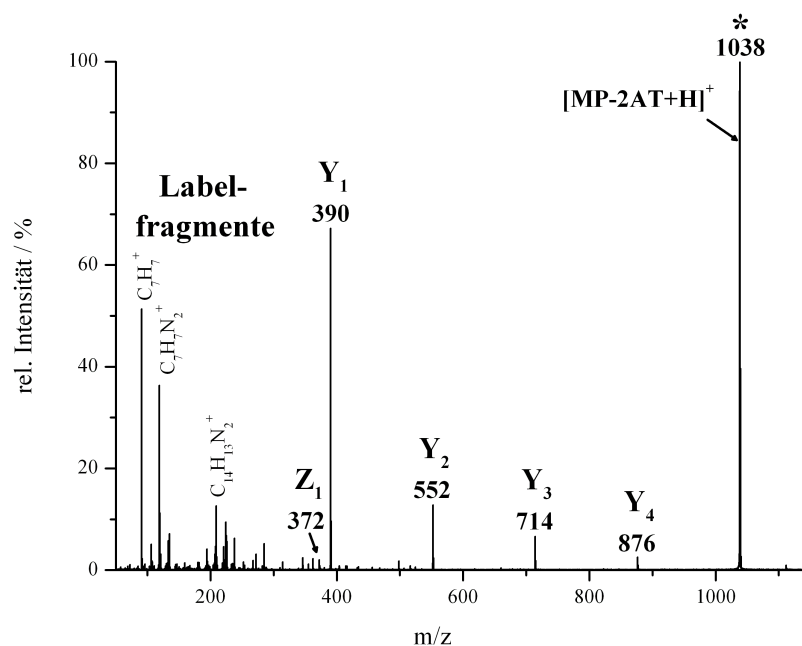


Abbildung 5.5: VisPD-Spektrum von $[Maltopentaose-2-Aminoazotoluol+H]^+$ (m/z 1038,4).

Diese können dem Z_1 -Fragment (m/z 372,2) und den Y-Fragmenten Y_1 (m/z 390,2), Y_2 (m/z 552,3), Y_3 (m/z 714,3) und Y_4 (m/z 876,4) zugeordnet werden, wobei die Y-Fragmente mit höheren Intensitäten anzutreffen sind (4 % - 70 %) als das Z_1 -Fragment (3 %). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Z-Fragmente aus dem jeweiligen Y-Fragment durch Eliminierung von Wasser entstehen.[63] Die Saccharidfragmente beinhalten ausnahmslos das reduzierende Ende des Oligosaccharids mit dem Label. Es finden ausschließlich glycosidische Bindungsbrüche und keine Ringbrüche statt.

Das VisPD-Spektrum von $[MP-Rh110+H]^+$ (m/z 1143,4) (Abb. 5.7) weist große Ähnlichkeiten mit dem Fragmentspektrum von $[MP-2AT+H]^+$ auf (Abb. 5.5). Es sind ebenfalls nur wenige Signale mit Saccharidanteil vorhanden (Abb. 5.6). Diese Signale können wieder dem Z_1 -Fragment (m/z 477,2) und den Y-Fragmenten Y_1 (m/z 495,1), Y_2 (m/z 657,2), Y_3 (m/z 819,2) und Y_4 (m/z 981,3) zugeordnet werden. Die Signale zwischen m/z 200 und m/z 400 resultieren aus dem Farbstoff und besitzen keinen Saccharidanteil. Alle beobachteten Saccharidfragmente in dem Spektrum enthalten wieder das reduzierende Ende des Oligosaccharids und das Label. Auch bei diesem Ion finden ausschließlich glycosidische Bindungsbrüche statt. Auch hier weisen die Y-Fragmente (Y_1 - Y_4) höhere Intensitäten auf (5 % - 55 %) als das Z_1 -Fragment (2,5 %).

Beide Derivate resultieren somit in PD-Fragmentspektren mit hohem Informationsgehalt. Die Derivate verlieren Monomere von dem nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids. Die Intensität der Y-Ionen sinkt von Y_1 nach Y_4 , was an der räumlichen Nähe der Bindungen zu dem Label liegt. Da die Fragmente die Chromophore noch besitzen, können sie weiter angeregt und nachfragmentiert werden.

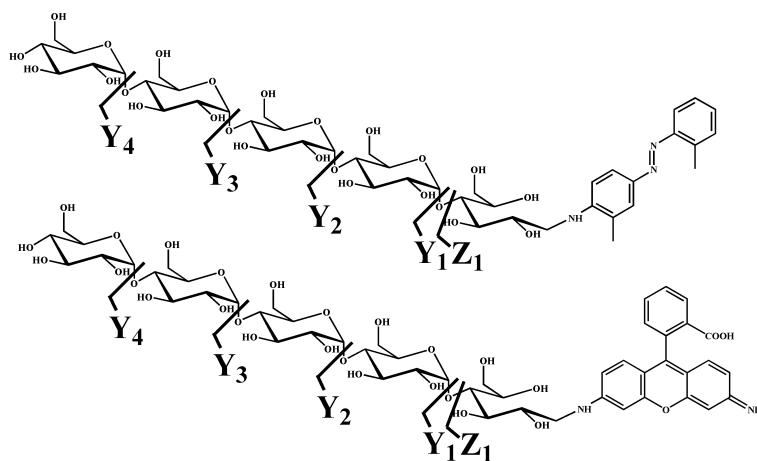
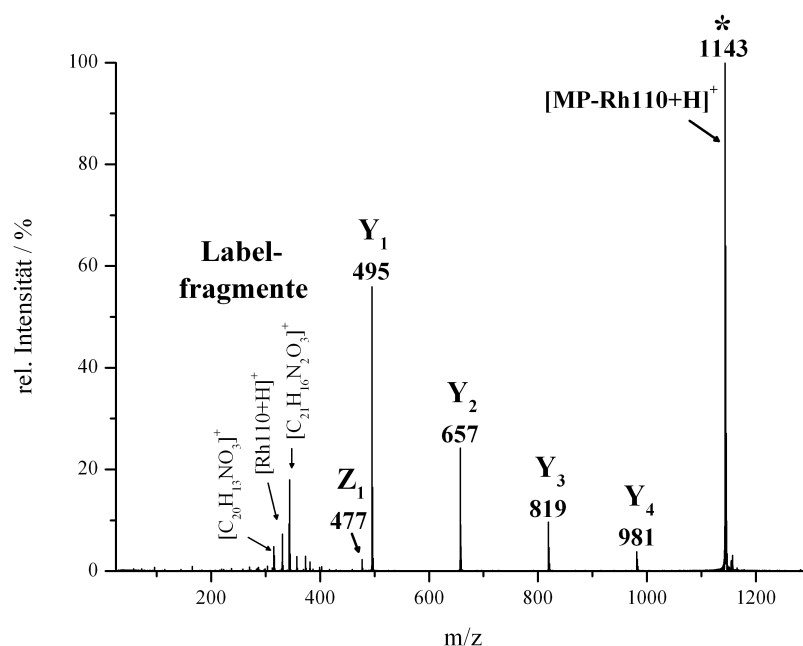


Abbildung 5.6: Fragmente mit Saccharidanteil von (oben) $[MP-2AT+H]^+$ und (unten) $[MP-Rh110+H]^+$ bei der CID und VisPD.

Abbildung 5.7: VisPD-Spektrum von [Maltopentaose-Rhodamin 110+H]⁺ (m/z 1143,4).

Die protonierte Spezies des underivatisierten Oligosaccharids $[M+H]^+$ fragmentiert ebenfalls durch glycosidische Bindungsbrüche und es treten keine Ringbrüche auf (Abb. 5.8). Die Fragmentierung erfolgt bei diesem Ion jedoch sowohl von dem nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids, als auch von dem reduzierenden Ende. Dies resultiert in bekannten Y- und Z-Fragmente oder führt zu B- und C-Fragmenten. Diese unterschiedlichen Fragmente sind nicht anhand ihrer Masse zu unterscheiden, was eine sichere Identifizierung der Signale verhindert.

Die CID-Spektren der beiden Derivate $[MP-2AT+H]^+$ (Abb. 5.9) und $[MP-Rh110+H]^+$ (Abb. 5.10) entsprechen bei alleiniger Berücksichtigung der Saccharidfragmente qualitativ den VisPD-Spektren (Abb. 5.5 und Abb. 5.7). Die Z₁-Fragmente sind ebenfalls nur mit geringer Intensität im Spektrum zu beobachten und die Intensität der Y-Serie nimmt wieder von Y₁ nach Y₄ ab. Im Gegensatz zu den VisPD-Spektren sind in den CID-Spektren die Farbstofffragmente nur von geringer Intensität.

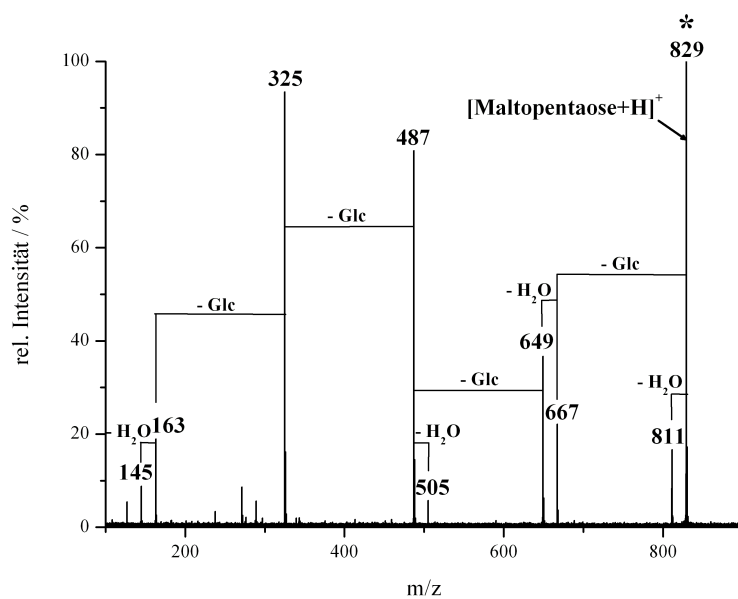


Abbildung 5.8: CID-Spektrum von [Maltopentaose+H]⁺ (m/z 829,3).

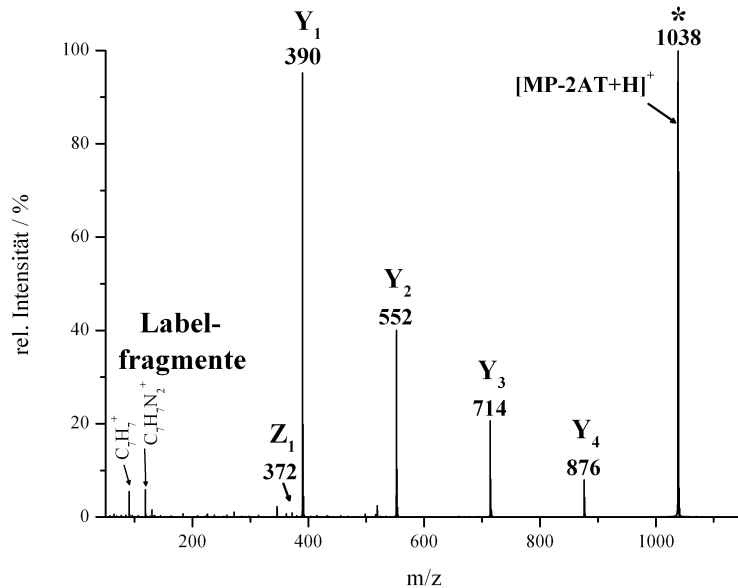


Abbildung 5.9: CID-Spektrum von [Maltopentaose-2-Aminoazotoluol+H]⁺ (m/z 1038,4).

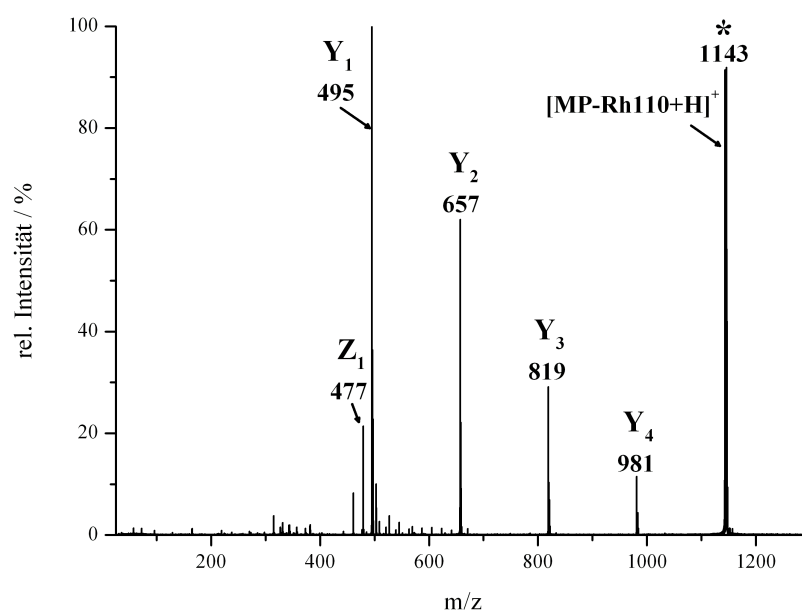


Abbildung 5.10: CID-Spektrum von [Maltopentaose-Rhodamin 110+H]⁺ (m/z 1143,4).

5.2 VisPD und CID der Lacto-N-fucopentaose I-Derivate und Lacto-N-fucopentaose II-Derivate

Die isomeren Oligosaccharide LNFP I und LNFP II wurden mit dem Farbstoff Rh110 und LNFP I wurde zusätzlich mit AMQ derivatisiert. Die protonierten Derivate und die underivatisierten Isomere wurden mittels VisPD und CID untersucht.

5.2.1 Lacto-N-fucopentaose I-Rhodamin 110 (LNFP I-Rh110) und Lacto-N-fucopentaose II-Rhodamin 110 (LNFP II-Rh110)

Das VisPD-Spektrum von [LNFP I-Rh110+H]⁺ (m/z 1168,4) (Abb. 5.11, oben) weist die Fragmente Z₁ (m/z 477,2), Y₁ (m/z 495,2), Y₂ (m/z 657,2) und Y₄ (m/z 1022,4) auf (Abb. 5.12). Das Fragment Y₄, welches durch die Eliminierung der endständigen Fucose entsteht, ist dabei nur von geringer Intensität (2 %). Das Y₃-Fragment, welches die zusätzliche Eliminierung von Galactose anzeigt, ist nicht zu beobachten. Ein weiteres

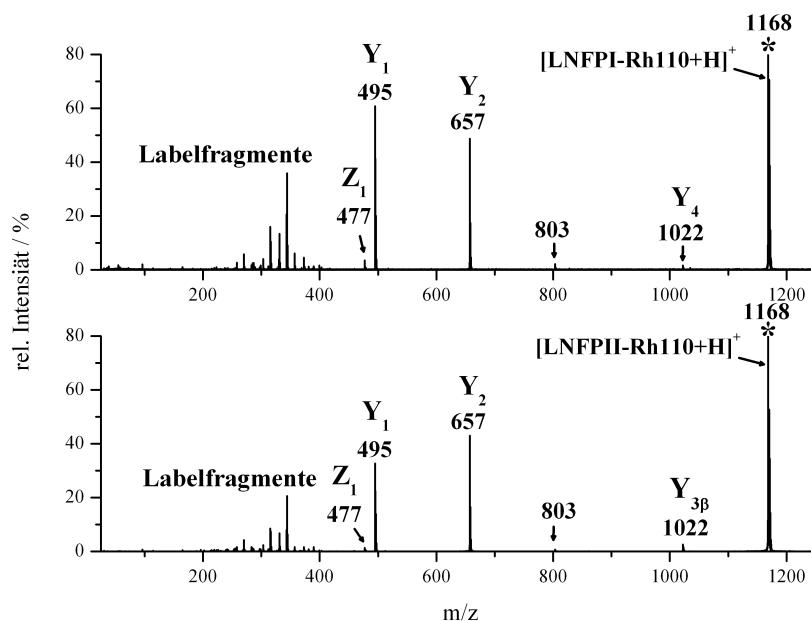


Abbildung 5.11: VisPD-Spektren von (oben) [LNFP I-Rh110+H]⁺ und (unten) [LNFP II-Rh110+H]⁺ (beide m/z 1168,4).

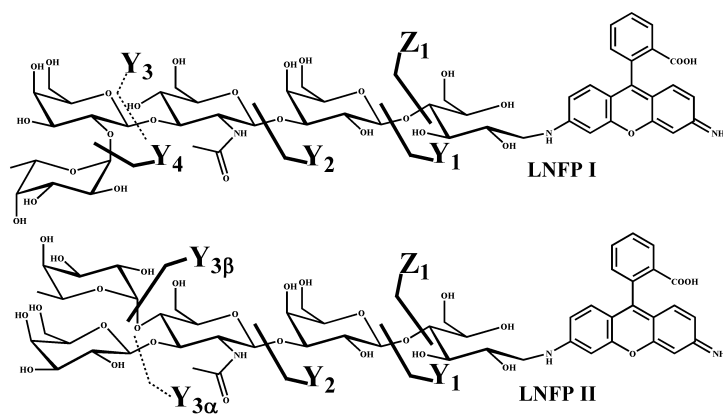


Abbildung 5.12: Fragmente mit Saccharidanteil von (oben) [LNFP I-Rh110+H]⁺ und (unten) [LNFP II-Rh110+H] bei der CID und VisPD. Die Eliminierung von Galactose (oben: Y₃, unten: Y_{3α}) wurde in den PD-Spektren nicht beobachtet.

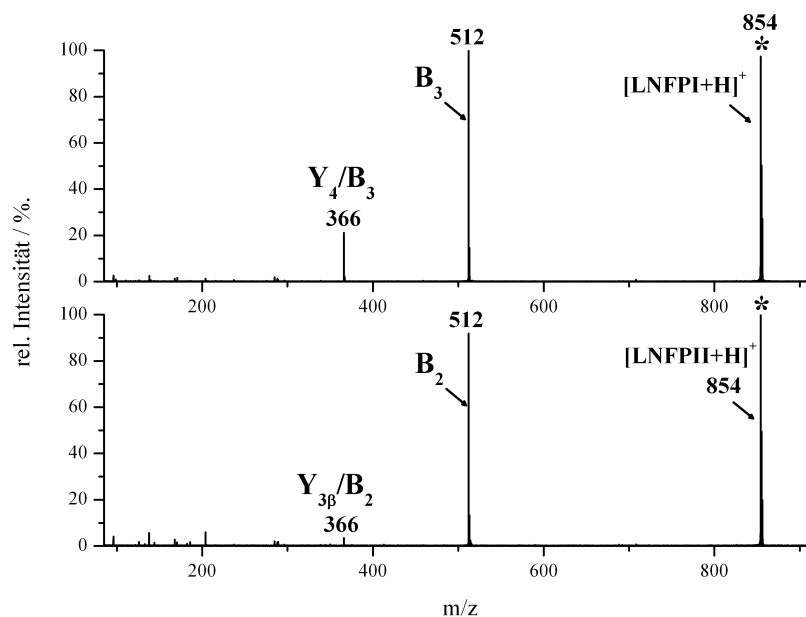


Abbildung 5.13: CID Spektrum von (oben) [LNFPI+H]⁺ und (unten) [LNFPII+H]⁺ (beide m/z 854,3).

Signal, das auf eine innere Eliminierung von GlcNAc und Galactose hinweist, ist mit geringer Intensität (2 %) bei m/z 803,3 zu erkennen. Die Signale zwischen m/z 200 und m/z 400 werden wieder durch Farbstofffragmente verursacht. Alle Fragmente mit Saccharidanteil enthalten auch das Label.

In dem PD-Massenspektrum von [LNFPII-Rh110+H]⁺ (m/z 1168,4) (Abb. 5.11, unten) sind qualitativ die gleichen Massensignale zu beobachten und die Spektren unterscheiden sich nur hinsichtlich der Signalintensitäten. Die Eliminierung von Fucose, die zu dem Y_{3β}-Fragment (m/z 1022,42) führt, weist wieder nur eine sehr geringe Intensität auf (3 %). Die Eliminierung der Galactose (Y_{3α} oder Y_{3α/3β}) ist auch hier nicht zu beobachten. Die Isomere sind anhand der PD-Spektren somit nicht zu unterscheiden.

Die CID-Spektren der underivatisierten Spezies [LNFPI+H]⁺ (m/z 854,3) und [LNFPII+H]⁺ (m/z 854,3) sind in Abb. 5.13 dargestellt. In den Spektren sind nur zwei Fragmentensignale zu erkennen. Bei dem Signal m/z 512,3 (LNFP I: B₃; LNFP II: B₂), handelt es sich um den glycosidischen Bindungsbruch am reduzierenden Ende des GlcNAc, welcher häufig in hoher Intensität stattfindet. Bei dem Fragment m/z 366 handelt es sich um ein inneres Fragment, bestehend aus einem GlcNAc und einer Galactose. Aufgrund der instabilen Bindung des GlcNAc handelt es sich bei LNFP I wahrscheinlich um das Frag-

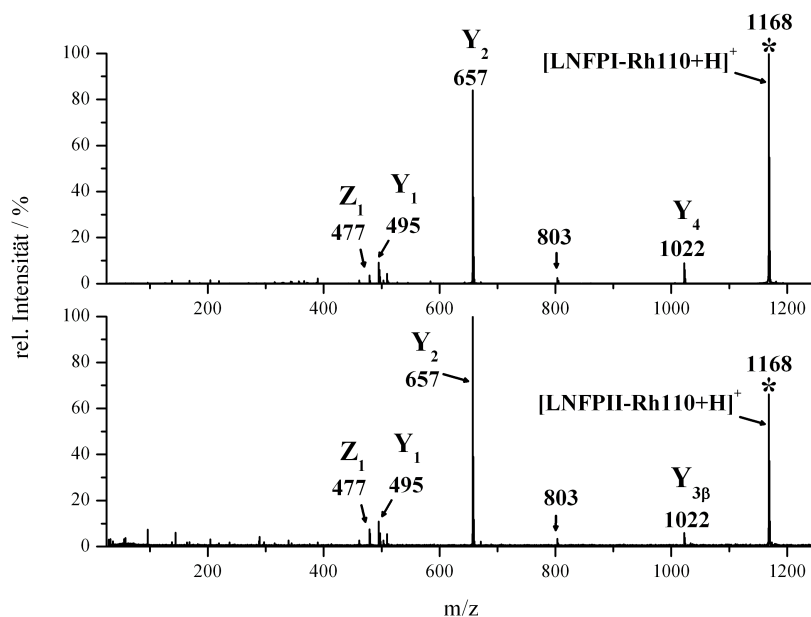


Abbildung 5.14: CID-Spektrum von (oben) [LNFP I-Rh110+H]⁺ und (unten) [LNFP II-Rh110+H]⁺ (beide m/z 1168,4).

ment B₃/Y₄ (LNFP II: B₂/Y_{3β}) und nicht um das Fragment B₄/Y₃ (LNFP II: B₃/Y_{3α/3β}), welches die gleiche Masse besitzt.

Im Unterschied zu den CID-Spektren der underivatisierten Moleküle können mehrere strukturelevante Informationen aus den Spektren der Derivate gewonnen werden.

In den CID-Spektren der Derivate [LNFP I-Rh110+H]⁺ und [LNFP II-Rh110+H]⁺ (Abb. 5.14) sind qualitativ die gleichen Saccharidfragmente zu beobachten wie in den VisPD-Spektren der jeweiligen Analyte (Abb. 5.11). Unter Verwendung der Stoßaktivierung werden, wie auch bei den MP-Derivaten, keine intensiven Farbstofffragmente zwischen m/z 200 und m/z 400 beobachtet. Es entstehen ausschließlich Saccharidfragmente, die durch glycosidische Bindungsbrüche gebildet werden und das reduzierende Ende des Oligosaccharids und das Label enthalten.

Trotz der qualitativen Ähnlichkeit der Fragmente sind zwischen den VisPD- und CID-Spektren deutliche Unterschiede hinsichtlich der Signalintensitäten vorhanden. Die Y₁-Fragmentsignale besitzen in den VisPD-Spektren hohe Intensitäten (LNFP I 61 %, LNFP II 33 %), in den CID-Spektren jedoch nur geringe Intensitäten (LNFP I 10 %, LNFP II 11 %). Die Y₄-Fragmente weisen in den CID-Spektren etwas höhere Intensitäten auf (LNFP I 10 %, LNFP II 6 %) als in den PD-Spektren (LNFP I 2 %, LNFP II 3 %).

Sowohl in den VisPD- wie auch in den CID-Spektren fällt das Fehlen der Y_3 -Fragmente (bzw. $Y_{3\beta/3\alpha}$ -Fragmente) und die geringe Intensität des Y_4 -Signals (bzw. $Y_{3\beta}$ -Signals) auf.

Die Fragmentensignale bei m/z 803,3, die auch in den CID-Spektren beider Isomere mit geringer Signalintensität (unter 4 %) zu beobachten sind, entstehen ausgehend von dem jeweiligen Vorläuferion durch den Verlust von m/z 365,1. Dies entspricht dem gleichzeitigen Verlust einer GlcNAc und einer Hexose (wahrscheinlich Gal), also von inneren Saccharidmonomeren. Diese innere Eliminierung ist nur mit einer vorherigen Fucoseumlagerung möglich.

Die Rh110-Derivate von LNFPI und LNFPII können auch mittels Stoßaktivierung nicht unterschieden werden.

5.2.2 Lacto-N-fucopentaose I-6-Aminoquinolin (LNFPI-AMQ)

Die protonierte Spezies $[\text{LNFPI-AMQ}+\text{H}]^+$ (m/z 983,4) wurde mittels VisPD und CID fragmentiert (Abb. 5.15) und das Spektrum mit dem der Spezies $[\text{LNFPI-Rh110}+\text{H}]^+$ verglichen (Abb. 5.11, oben).

Die VisPD-Spektren weisen ähnliche Fragmente auf, wobei das Spektrum der AMQ-Derivate zusätzliche Saccharidsignale zeigen. Alle Fragmente in diesem Spektrum werden durch glycosidische Bindungsbrüche gebildet. Die Fragmente Z_1 (m/z 291,1), Y_1 (m/z 309,1), Y_2 (m/z 471,2) und Y_4 (m/z 836,3) entstehen, wobei das Y_4 -Fragment hier eine deutlich höhere Intensität besitzt (19 %) als in dem PD-Spektrum des Rh110-Derivats. Eine Y_3 -Fragmentierung findet wieder nicht statt und die Eliminierung von m/z 365,1 führt zu einem Fragment von geringer Intensität (7 %) bei m/z 617,3. Dieses Signal wird wahrscheinlich wieder durch eine Fucoseumlagerung und die innere Eliminierung von einem GlcNAc und einer Galactose gebildet.

Die zusätzlichen Saccharidsignale in dem AMQ-Spektrum liegen bei m/z 512,2, m/z 366,1 und m/z 204,1. Dabei findet die Fragmentierung entweder von dem reduzierenden Ende des Saccharids statt oder es handelt sich dabei um innere Fragmente. Bei dem Fragmentensignal m/z 512,2 handelt es sich wahrscheinlich, wie bei der underivatisierten Spezies, um das B_3 -Ion, welches durch einen glycosidischen Bindungsbruch an dem GlcNAc entsteht. Das Fragment bei m/z 366,1 stellt wieder ein protoniertes Disaccharid aus GlcNAc und Galactose dar. Das Signal bei m/z 204,1 wird durch ein protoniertes GlcNAc verursacht. Fragmente, die von dem Farbstoff verursacht werden, sind bei dem VisPD-Spektrum unter m/z 200 zu beobachten.

Das protonierte Derivat $[\text{LNFPI-AMQ}+\text{H}]^+$ weist bei der CID ähnliche Fragmente

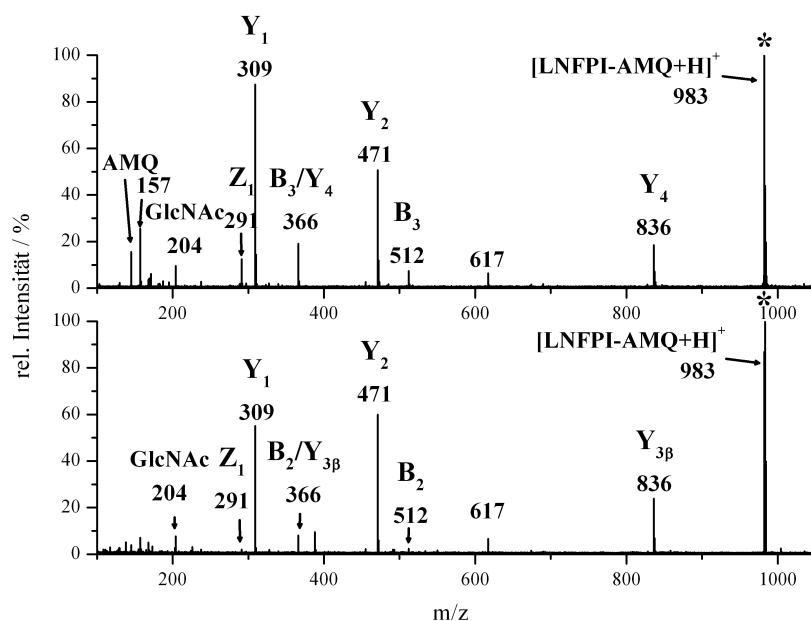


Abbildung 5.15: VisPD-Spektrum (oben) und CID-Spektrum (unten) von $[\text{LNFPI-AMQ+H}]^+$ (m/z 983,4).

auf, wie bei der VisPD (Abb. 5.15). Die Signale besitzen jedoch unterschiedliche Intensitäten. Die glycosidischen Fragmente Z_1 (m/z 291,1), Y_1 (m/z 309,1), Y_2 (m/z 471,2) und Y_4 (m/z 836,3) können beobachtet werden, wobei das Y_1 - und das Z_1 -Fragment in dem CID-Spektrum geringere Intensitäten besitzen. Die zusätzlichen Saccharidfragmente ohne AMQ-Anteil sind wieder bei m/z 512,2, m/z 366,1 und m/z 204,1 zu beobachten. Diese Fragmente besitzen, im Vergleich zu den VisPD-Spektren, ebenfalls geringere Signalintensitäten.

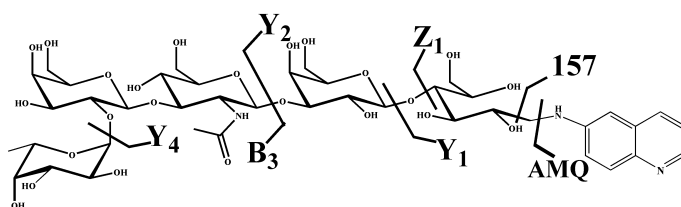


Abbildung 5.16: Fragmente mit Saccharidanteil von $[\text{LNFPI-AMQ+H}]^+$ bei der CID und VisPD.

5.3 VisPD von Oligosaccharid-Farbstoff-Clustern

Die Derivatisierung von Oligosacchariden ist ein Arbeitsschritt, der auch außerhalb der PD-Methoden Verwendung findet, um z.B. die Trenneffizienz bei chromatographischen und elektrophoretischen Methoden zu verbessern oder die Ionenausbeute bei der MS zu erhöhen.[43] Es handelt sich aber um einen zeit- und kostenintensiven Arbeitsschritt. *Wilson et al.* zeigen für protonierte Peptide, dass auch nicht-kovalent gebundene Kroneetherkomplexe eine adäquate Peptidfragmentierung mittels UVPD ermöglichen.[107] Im Weiteren wurde untersucht, ob VisPD auch bei nicht kovalent gebundenen Oligosaccharid-Farbstoff-Komplexen anwendbar ist.

5.3.1 Clusterverhalten von LNFP II mit verschiedenen Farbstoffen

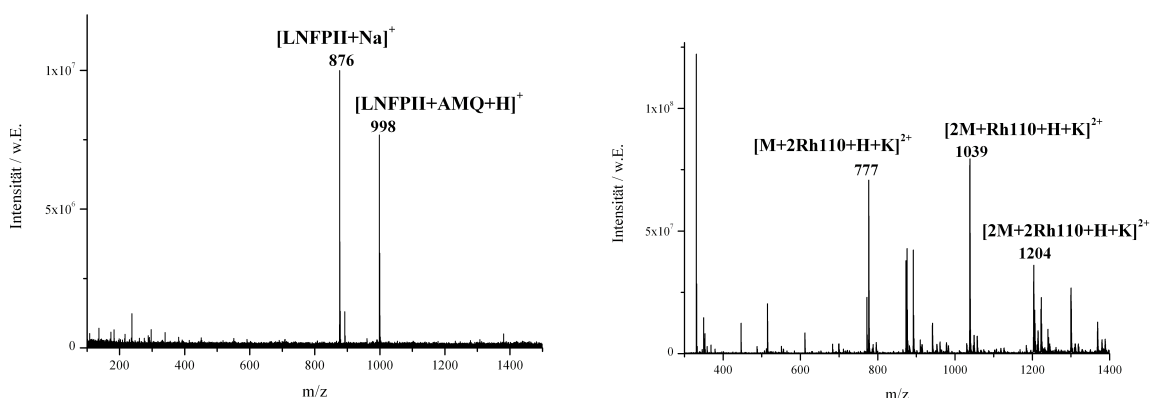


Abbildung 5.17: Links: Übersichtsspektrum von LNFP II mit Zugabe von 6-Aminoquinolin und Bildung des Clusters $[\text{LNFP II}+6\text{AMQ}+\text{H}]^+$ (m/z 998,4); rechts: Übersichtsspektrum von LNFP II mit Zugabe von Rhodamin 110 und Bildung verschiedener Cluster.

Die Chromophore PI, PF, 2AT, Rh110 und 6-Aminoquinolin wurden zu LNFP II gegeben und das resultierende Clusterverhalten wurde untersucht. Unter den gewählten Bedingungen sind in den Übersichtsspektren der Amine AMQ und Rh110 Cluster von höherer Intensität zu beobachten (Abb. 5.17). Das Clusterverhalten der beiden Farbstoffe unterscheidet sich dabei deutlich. Bei Zugabe von AMQ wird nur der Cluster $[\text{LNFP II}+\text{AMQ}+\text{H}]^+$ (m/z 998,4) gebildet. Mit Rh110 werden verschiedene LNFP II-Cluster beobachtet, dazu gehören $[2\text{M}+\text{Rh110}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ (m/z 1038,8), $[\text{M}+2\text{Rh110}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ (m/z 777,4) und $[2\text{M}+2\text{Rh110}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ (m/z 1204,8).

$H+K]^{2+}$ (m/z 776,7) und $[2M+2Rh110+H+K]^{2+}$ (m/z 1203,8). Unter Vis-Einstrahlung fragmentiert nur der Cluster $[LNFPII+AMQ+H]^+$, die Rh110-Cluster fragmentieren bei keiner der verwendeten Laserwellenlängen des Argon-Ionen-Lasers.

5.3.2 VisPD von $[LNFPII+AMQ+H]^+$

Bei der Spezies $[LNFPII+AMQ+H]^+$ (m/z 998,4) handelt es sich wahrscheinlich um einen über ein Proton verbrückten Cluster[107]. Dieser fragmentiert unter Einstrahlung von visuellem Licht bei 454 nm (Abb. 5.18).

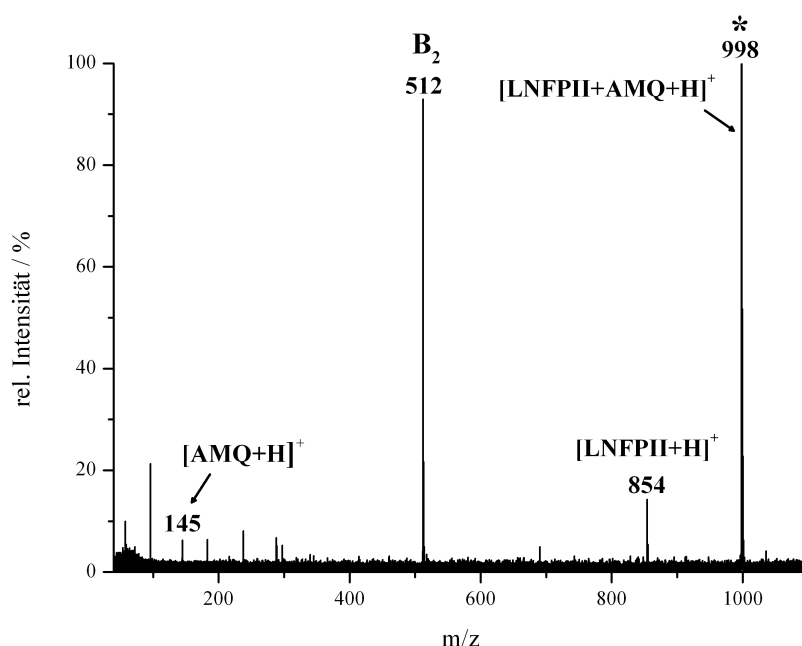


Abbildung 5.18: VisPD-Spektrum des Clusters $[LNFPII+AMQ+H]^+$ (m/z 998,4).

Bei dem intensivsten Fragmentsignal im Spektrum (93 %) handelt es sich um das protonierte B₂-Ion bei m/z 512,2, welches durch einen glycosidischen Bindungsbruch gebildet wird. Dieses B₂-Fragment ist auch in den CID-Spektren der protonierten Spezies $[LNFPII+H]^+$ das intensivste Signal (Abb. 5.13).

In dem Produktspektrum sind keine weiteren Saccharidfragmente zu beobachten, lediglich die protonierten Moleküle LNFPII (m/z 854,3) und AMQ (m/z 145,1) sind mit geringen Intensitäten (unter 15 %) zu beobachten.

5.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Fragmentierungsmuster bei der VisPD

Es konnte gezeigt werden, dass die Photodissoziation mit sichtbarem Licht (VisPD) zur Fragmentierung von Oligosacchariden verwendet werden kann. Mit Hilfe dieser Fragmentierungsmethode werden reproduzierbare MS/MS-Spektren erzeugt, die sequenzspezifische Fragmente aufweisen.

Die Oligosaccharide wurden zuvor zur Verbesserung ihrer Absorption durch reduktive Aminierung mit geeigneten Chromophoren derivatisiert. Dabei zeigen die Rh110- und 2AT-Derivate die besten Fragmentierungseigenschaften.

Bei der VisPD der protonierten Derivate werden ausschließlich glycosidische Bindungsbrüche beobachtet. Die Fragmentierung erfolgt bei diesen Derivaten von den nicht-reduzierenden Enden der Oligosaccharide und resultiert in intensive Y- und weniger intensive Z-Typ-Ionen. Es ist davon auszugehen, dass ein Z-Fragment durch Wasserabspaltung aus einem Y-Ion gebildet wird.[63] Aufgrund der relativ langen Einstrahlung ist weiterhin davon auszugehen, dass die Fragmente nachaktiviert werden und so Sekundärionen entstehen. Die Intensität der Y-Typ-Fragmentierung nimmt bei Maltopentaose mit der Entfernung zum Label ab.

Bei den Rh110-Derivaten von LNFP I und LNFP II ist ein anderes Intensitätsmuster zu erkennen. In dem VisPD-Spektrum des LNFP I-Derivats besitzt das Y_2 -Fragment ähnliche Intensitäten wie das Y_1 Fragment. In dem Spektrum des LNFP I-Derivats ist die Intensität des Y_2 -Signals größer als die des Y_1 -Signals. Dieser Effekt wird durch das GlcNAc verursacht. Im protonierten Zustand ist die glycosidische Bindung an der reduzierenden Seite dieses Monomers destabilisiert und Bindungsbrüche treten bevorzugt an dieser Position auf.[78]

Bei den Maltopentaose-Derivaten wird die komplette Y-Typ-Serie in den VisPD-Spektren beobachtet. Dies ist bei den LNFP I- und LNFP II-Derivaten von Rh110 und dem LNFP I-AMQ nicht der Fall. Die geringe Intensität des Y_4 -Signals (LNFP I) bzw. $Y_{3\beta}$ -Signals (LNFP II) kann durch die bevorzugte Bildung des Y_2 -Fragments hervorgerufen werden. Diese Eliminierung von m/z 365,1 tritt ebenfalls bei dem Derivat LNFP I-AMQ auf. Das Fehlen des $Y_{3\beta}$ -Signals bei LNFP I zeigt außerdem eine bevorzugte Eliminierung der Fucose an. Das Y_3 - (LNFP I) bzw. $Y_{3\beta/3\alpha}$ -Fragment (LNFP II) wird nicht gebildet. Welche Mechanismen für das Fehlen dieser Fragmente verantwortlich sind, konnte bislang nicht geklärt werden.

Weitere unerwartete Fragmente der Rh110-Derivate werden bei m/z 803,3 beobachtet. Diese Fragmente werden durch die Eliminierung von m/z 365,1 verursacht. Es handelt sich wahrscheinlich um die Eliminierung von GlcNAc und Galactose, welche nur mit einer vorherigen Fucoseumlagerung möglich ist. Diese Art der Glycosylumlagerungen ist für protonierte Oligosaccharide bekannt [66, 67, 68] und wird vermehrt bei Oligosacchariden beobachtet, die am reduzierenden Ende durch reduktive Aminierung derivatisiert wurden.[96, 97, 98, 99] Die Umlagerung der Fucose wurde von *Lebrilla et al.* auch in CID-Spektren von LNFP I und LNFP II beobachtet, die mit Benzylamin und 9-Aminofluoren derivatisiert waren.[96]

Harvey et al. zeigen, dass die Basizität des Chromophors einen Einfluss auf die Signalintensität der Fucoseumlagerung besitzt. Die Indikatorfragmente nehmen dort mit größerer Basenstärke des Amins zu.[99] Dies konnte nicht bestätigt werden. Rh110 besitzt eine größere Basizität als das AMQ, bei dem AMQ-Derivat konnten jedoch intensivere Indikatorfragmente (7 %) beobachtet werden als bei dem Derivat LNFP I-Rh110 (2 %). Jedoch kann bei dem Rh110-Derivat die Protonierung auch an der Aminogruppe stattfinden, die an der Bindung zum Oligosaccharid nicht beteiligt ist. Es wird angenommen, dass gerade die Protonierung am bindenden Stickstoff die Umlagerungsreaktion initiiert (Abschn. 3.2.4). Es ist ebenso denkbar, dass der zeitliche Verlauf des Experiments die Intensität der Umlagerungsreaktion beeinflusst. So wurden Indikatorfragmente bei schnelleren Experimenten, wie der TOF-MS, in geringerer Intensität beobachtet als bei ICR-Experimenten.[96] Bei der Fragmentierung der AMQ-Derivate wurde aufgrund der geringeren Absorption der Moleküle eine längere Einstrahlzeit gewählt.

Vergleich VisPD und CID

Die VisPD verursacht ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie die CID. Beide Methoden verursachen ausschließlich glycosidische Bindungsbrüche und es werden die gleichen Saccharidfragmente beobachtet. Die Isomeren LNFP I und LNFP II können weder mit der VisPD noch mit der CID unterschieden werden.

Im Unterschied zu den CID-Spektren sind in den VisPD-Spektren signalintensive Farbstofffragmente zu erkennen. Die Fragmentintensitäten der Maltopentaose-Derivate sind unter den gewählten Bedingungen vergleichbar. Jedoch sind bei den Rh110-Derivaten von LNFP I und LNFP II unterschiedliche Fragmentintensität zu bemerken. Bei der CID sind die Y_2 -Fragmentationen die intensivsten Signale im Spektrum, wohingegen andere Y-Fragmente nur mit geringen Intensitäten (unter 15 %) gebildet werden. Dieser Effekt wird

durch die bevorzugte Fragmentierung an der reduzierenden Seite des GlcNAc hervorgerufen und wird in einem geringeren Ausmaß auch in den VisPD-Spektren beobachtet. Es ist davon auszugehen, dass die VisPD eine höherenergetische Anregungsmethode als die CID ist, weshalb die Fragmentierung weniger selektiv erfolgt.

Einfluss des Labels

Wilson et al. zeigen, dass die starke Wasserstoffbindung zwischen einem Kronenether und einem Peptid in einem protonierten Cluster bei der UVPD einen effektiven Energietransfer zwischen Chromophor und Peptid zulässt.[107] Auch *Pikulski et al.* zeigen, dass ein komplex gebundenes Chromophor die IR-Absorption von Flavonoiden bei der IRMPD verbessert.[118]

Für den Saccharidcluster $[\text{LNFPI}+\text{AMQ}+\text{H}]^+$ kann auch ein Energietransfer zwischen Farbstoff und Oligosaccharid festgestellt werden, der zu einer Fragmentierung des Oligosaccharids führt. Die Energieübertragung zwischen Chromophor und Oligosaccharid ist jedoch gering und lediglich die labile glycosidische Bindung an dem GlcNAc wird gebrochen. Weitere Saccharidfragmente mit Strukturinformationen werden nicht gebildet. Damit ergibt die VisPD des Clusters ein informationsarmes Spektrum.

Bei Verwendung eines kovalent gebundenen Labels wird ein besserer Energietransfer gewährleistet. Das Label besitzt dabei einen großen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten der Analyte. Unter Verwendung von PF, 2AT, Rh110 und AMQ findet die Protonierung bevorzugt an einer Aminogruppe des Farbstoffes statt. Bei PI ist die Ladung am Farbstoff lokalisiert. Die verschiedenen Maltopentaose-Derivate weisen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Stabilität und Fragmentierung auf.

Die Saccharidfragmente, die bei diesen Derivaten beobachtet wurden, enthalten den Farbstoff und die Fragmentierung erfolgt von dem nicht-reduzierenden Ende des Saccharids. Dieses Fragmentierungsverhalten ist sowohl mit VisPD, wie auch mit CID zu beobachten und wurde bereits bei verschiedenen anderen Oligosaccharid-Derivaten bei PD-Methoden[61, 71] und der CID[136] beobachtet.

Unter Verwendung von AMQ als Label wurde bei $[\text{LNFPI-AMQ}+\text{H}]^+$ ebenfalls eine Fragmentierung von beiden Seiten des Oligosaccharids beobachtet. Dies resultiert in einem komplexerem Spektrum, welches aber auch zusätzliche Strukturinformationen beinhaltet. Dieser Effekt kann durch die geringere Basenstärke des AMQ verursacht werden.

Die underivatisierten, protonierten Oligosaccharide fragmentieren von beiden Seiten. Dies resultiert im Falle der Maltopentaose in einer größeren Anzahl von Fragmenten, jedoch ist eine genaue Signalzuordnung nicht möglich. Für LNFP I und LNFP II konnte nur das B₃ (LNFP I) bzw. B₂ -Fragment (LNFP I) mit großer Intensität beobachtet werden. Somit wird allein durch die Verwendung eines Labels ein fragmentreicheres und somit informativeres Spektrum der LNFP-Moleküle erhalten.

6

Kapitel 6

CID der dimeren und trimeren Cluster

Bei Oligosacchariden ist die Verwendung einer Mischung von Methanol und Wasser (1:1 (v/v)) als ESI-Lösungsmittel weit verbreitet. *Levin et al.* zeigen, dass bei Verwendung eines weniger polaren ESI-Lösungsmittels wie Tetrachlorethan:Methanol (1:1 (v/v)) die Bildung von Clustern unterdrückt und größtenteils die protonierten Spezies gebildet werden.[54] Zur Begünstigung der Clusterbildung aus dem Farbstoff Rh110 und dem Oligosaccharid LNFP II wurde die Polarität des Lösungsmittels heraufgesetzt und Wasser als ESI-Lösungsmittel verwendet. Dabei bilden sich die Cluster $[LNFP_{II}+2Rh110+H+K]^{2+}$ (m/z 776,7), $[2LNFP_{II}+Rh110+H+K]^{2+}$ (m/z 1038,8) und $[2LNFP_{II}+2Rh110+H+K]^{2+}$ (m/z 1203,9) mit hohen Signalintensitäten (Abb. 5.17).

Der intensivste Cluster $[2LNFP_{II}+Rh110+H+K]^{2+}$ (m/z 1038,8) wurde isoliert und mittels CID fragmentiert (Abb. 6.1). In dem Fragmentspektrum sind nur wenige Signale zu erkennen. Der Cluster zerfällt zu dem protonierten Farbstoff (m/z 331,1), welcher mit 88 % die höchste Fragmentintensität besitzt und dem Kalium-Adduktion $[LNFP_{II}+K]^+$ (m/z 892,3) (5 %). Überraschenderweise ist auch das Sacchariddimer $[2LNFP_{II}+H+K]^{2+}$ (m/z 873,3) zu beobachten, wenn auch nur mit geringer Intensität (3 %).

Im Allgemeinen wird angenommen, dass dimere Saccharidcluster, wie $[2M+H+K]^{2+}$, nur schwach verbrückt und strukturlabil sind.[57] Dimere und trimere Cluster von Oligosacchariden werden dementsprechend nicht als Vorläuferionen in der Tandem-MS verwendet. Des Weiteren werden sie gewöhnlich nur mit geringen Intensitäten gebildet.

Im folgenden Abschnitt wurde die Bildung und Fragmentierung von verschiedenen dimeren und trimeren Clustern untersucht. Dabei soll gezeigt werden, dass verschiedene Cluster in ihren Bildungsintensitäten und auch in ihrem Fragmentierungsverhalten

außergewöhnliche Eigenschaften aufweisen.

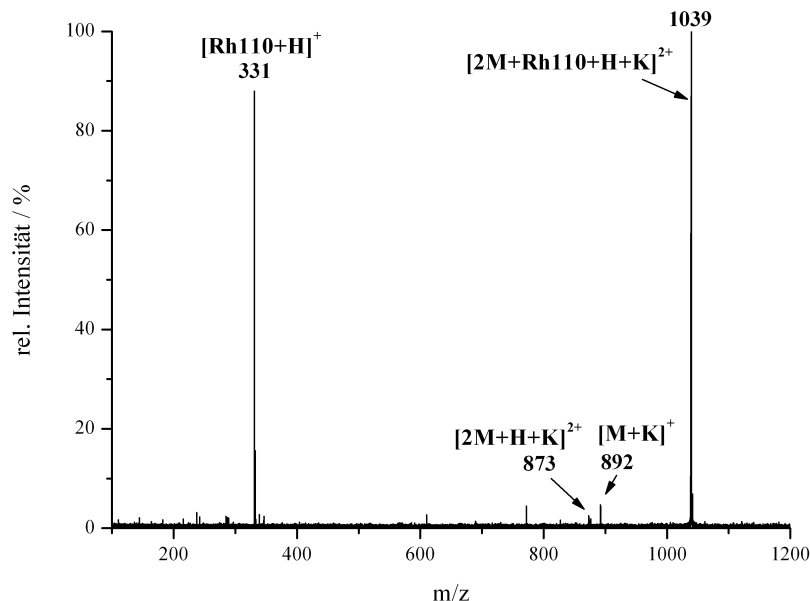


Abbildung 6.1: CID-Spektrum des Clusters $[2LNFP II+Rh110+H+K]^{2+}$ (1039,4).

6.1 Bildung von Alkali-Adduktionen von LNFP I und LNFP II

6.1.1 Übersichtsspektren von LNFP I und LNFP II ohne Zugabe von Additiven

Unter Verwendung von Wasser als ESI-Lösungsmittel und ohne Zugabe von Additiven konnten bei LNFP I und LNFP II zahlreiche Natrium- und Kalium-Adduktionen beobachtet werden (Abb. 6.2). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der Massenfokus des FT-ICR-MS auf die höheren m/z-Verhältnisse der einfach geladenen Monomere gelegt wurde. Die gebildeten zweifach geladenen Monomere bei kleinerem m/z-Verhältnis sowie die zweifach geladenen Trimere bei größerem m/z-Verhältnis werden diskriminiert und die Signalintensitäten zwischen den unterschiedlichen Massenbereichen sind nicht vergleichbar (Abb. B.3). Des Weiteren ist zu beachten, dass zweifach geladene Ionen, aufgrund der Funktionsweise der Detektion in der ICR-Zelle, doppelt so hohe Intensitäten wie einfach geladene Ionen besitzen (siehe Abschn. 2.2.1).

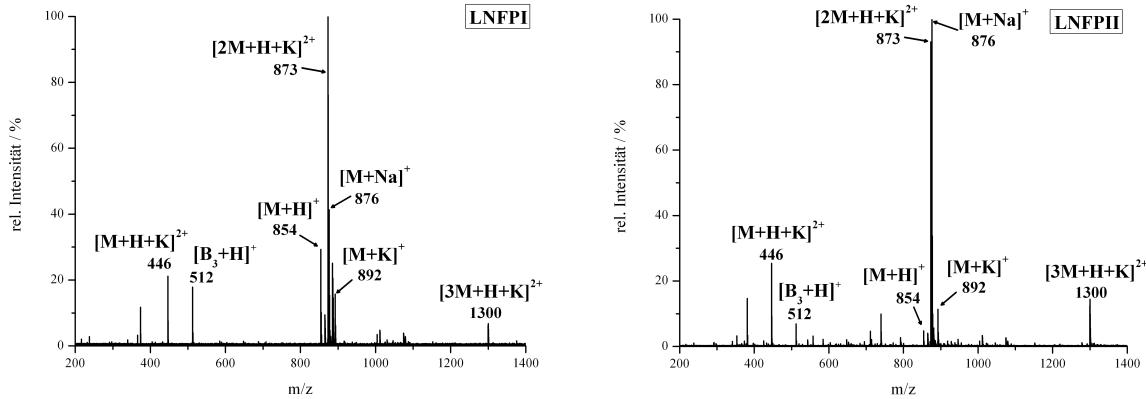


Abbildung 6.2: Links: Übersichtsspektrum von 10 μ M LNFP I in Wasser. Rechts: Übersichtsspektrum von 10 μ M LNFP II in Wasser.

Bei dem Signal m/z 876,3, welches mit hoher Intensität zu beobachten ist, handelt es sich um das Na-Adduktion $[M+Na]^+$. Die protonierten Moleküle $[M+H]^+$ (m/z 854,3) und Adduktionen $[M+K]^+$ (m/z 892,3) werden hingegen nur mit geringer Intensität gebildet. Weitere Signale sind bei m/z 446,6 zu beobachten und stellen die zweifach geladene Spezies $[M+H+K]^{2+}$ dar. Diese Ionenspezies wurde bereits von *Harvey et al.* beobachtet, wobei sie die einzige zweifach geladene Spezies des Glycans $GlcNAc_2Man_5$ darstellte.[49] Bei diesen Experimenten wurde jedoch eine Mischung aus $MeOH:H_2O:HCOOH$ (49,9:49,9:0,2 (v/v/v)) als Lösungsmittel verwendet. Mit Wasser als Lösungsmittel werden in den ESI-Spektren noch weitere zweifach geladene Adduktionen beobachtet. Mit auffälligen Intensitäten bilden sich die Dimere $[2M+H+K]^{2+}$. Diese Spezies wurde bereits bei der CID des Clusters $[2LNFP II+Rh110+H+K]^{2+}$ als Fragment beobachtet (Abb. 6.1). Weiterhin werden die weniger intensiven Oligosacchariddimere $[2M+H+Na]^{2+}$ (m/z 865,3) und die Trimere $[3M+H+K]^{2+}$ (m/z 1299,9) gebildet. Adduktionen von sehr geringer Intensität sind die zweifach geladenen Saccharidmonomere $[M+H+Na]^{2+}$ (m/z 438,6), $[M+2Na]^{2+}$ (m/z 449,6) und die zweifach geladenen Saccharidtrimere $[3M+H+Na]^{2+}$ (m/z 1292,0), $[3M+2Na]^{2+}$ (m/z 1302,9) und $[3M+Na+K]^{2+}$ (m/z 1310,9) (Abb. 6.3).

Die Signalintensität der Saccharidcluster variiert empfindlich mit dem eingesetzten ESI-Lösungsmittel. Bei Verwendung einer Mischung aus $MeOH:H_2O:HCOOH$ (49,9:49,9:0,2 (v/v/v)) als ESI-Lösungsmittel (Abb. 6.4) wurde die Spezies $[2M+H+K]^{2+}$ nicht und unter Verwendung von $MeOH:H_2O$ (1:1 (v/v)) (Abb. B.1) weniger intensiv gebil-

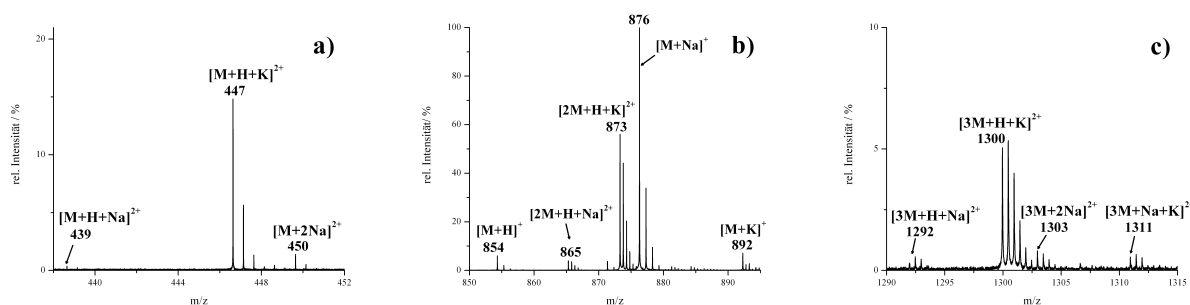


Abbildung 6.3: Ausschnitte von verschiedenen Bereichen des Massenspektrums von 10 µM LNFP II in Wasser: a) zweifach geladene Monomere, b) einfach geladene Monomere und zweifach geladene Dimere, c) zweifach geladene Trimere.

det. Neben dem ESI-Lösungsmittel besitzen auch andere Parameter, wie z.B. chemische Verunreinigungen oder der Quelledruck, einen Einfluss auf die Intensitäten der gebildeten Adduktionenspezies. Die Signalintensitäten variieren zwischen verschiedenen zeitlich auseinanderliegenden Messungen. So wurden Dimere nach dem Ausheizen der ICR-Zelle und dem Reinigen der Quelle in höherer Intensität gebildet (Abb. B.5), wohingegen sie nach längeren CID-Messungen, welche eine Druckerhöhung in der Zelle verursachen, kaum oder gar nicht zu beobachten sind. Trotz der experimentellen Einschränkung ist die bevorzugte Bildung des Clusters $[2M+H+K]^{2+}$ in den Spektren deutlich zu erkennen.

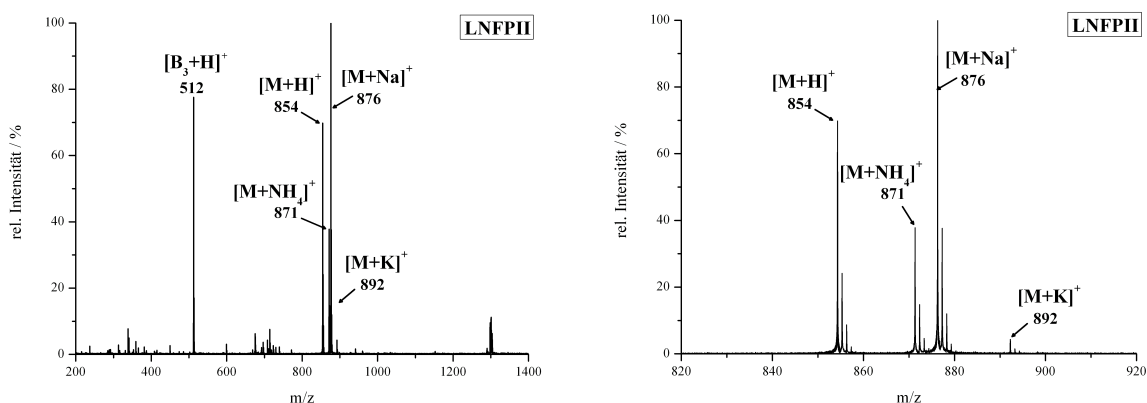


Abbildung 6.4: Links: Übersichtsspektrum von 10 µM LNFP II in MeOH:H₂O:HCOOH (49,9:49,9:0,2 (v/v/v)), rechts: Ausschnitt von m/z 820 bis m/z 920.

6.1.2 Übersichtsspektren

Oligosaccharide mit unterschiedlichen strukturellen und chemischen Eigenschaften, wie Maltopentaose (Abb. B.7) und LS-Tetrasaccharid c (LSTc) (Abb. B.7) weisen ebenfalls die Bildung verschiedener Cluster auf. Maltopentaose ist ein Pentasaccharid aus Glucoseeinheiten, LSTc ist ein verzweigtes Tetrasaccharid mit einer Säurefunktion (α -Neu5Ac-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc). Die ESI-Spektren der beiden Substanzen sind in Abb. 6.5 dargestellt. Bei beiden Sacchariden wurde Wasser als ESI-Lösungsmittel verwendet. Eine Zuordnung aller Fragmente sowie Ausschnitte der Spektren über den m/z -Bereich des Clusters befinden sich im Anhang (Tab. B.2 und Abb. B.4). Beide Massenspektren weisen mit hohen Intensitäten die Cluster $[2M+H+K]^{2+}$ auf (MP: m/z 848,3; LSTc: m/z 1018,3). Anhand dieser Ergebnisse kann gezeigt werden, dass die Bildung dieses Clusters nicht auf die LNFP-Serie beschränkt ist.

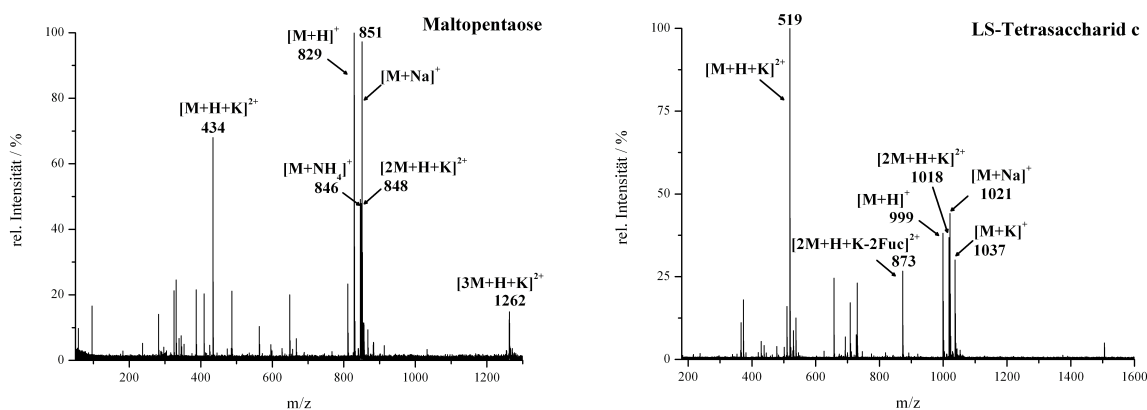


Abbildung 6.5: Links: Übersichtsspektrum von 10 μ M Maltopentaose in Wasser; rechts: Übersichtsspektrum von 10 μ M LS-Tetrasaccharid c in Wasser.

6.1.3 Fragmentierungseffizienzen der verschiedenen Adduktionen bei IR-Einstrahlung

Zur Untersuchung der Fragmentierungseffizienz bei IR-Einstrahlung wurde die Laserleistung eines 50 W CO₂-Lasers zwischen 0 % und 90 % variiert. Dabei wurde jeweils eine Einstrahlzeit von 0,1 s verwendet. Abb. 6.6 zeigt die Signalintensitäten der ver-

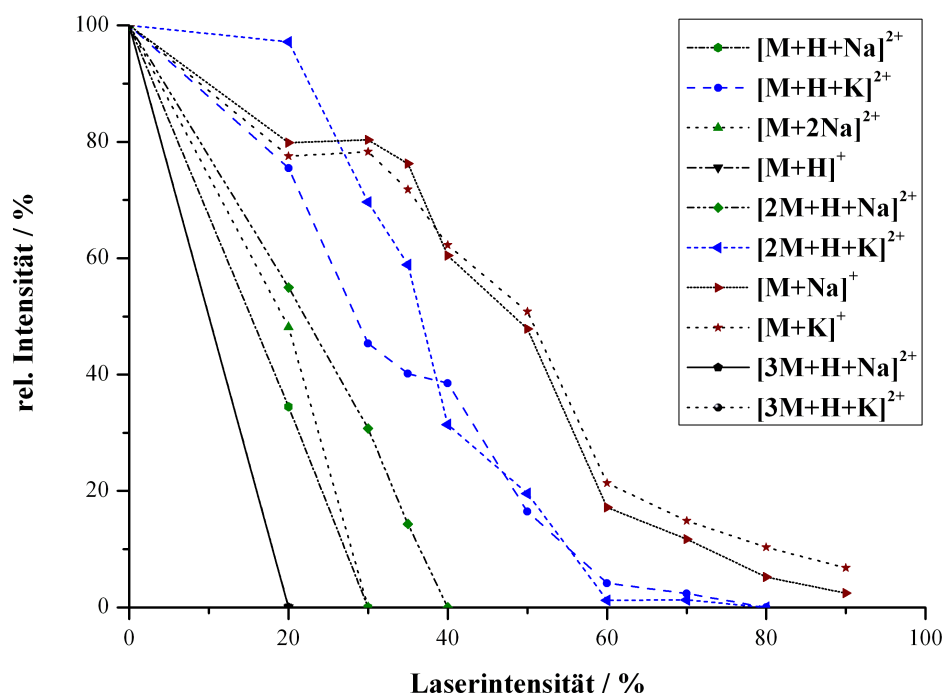


Abbildung 6.6: Fragmentierungseffizienzen verschiedener Adduktionen von LNFP II bei Laserintensitäten von 0 % bis 90 % eines 50 W CO₂-Lasers.

schiedenen Ionen von 10 μ M LNFP II in Wasser bei verschiedenen Laserleistungen. Anhand der Auftragungen wird deutlich, dass die Fragmentierungseffizienz der verschiedenen Ionen unter IR-Einstrahlung variiert. Die protonierte Spezies $[M+H]^+$, die Saccharidtrimere $[3M+H+Na]^{2+}$ und $[3M+H+K]^{2+}$ und das zweifach geladene Monomer $[M+H+Na]^{2+}$ zeigen unter IR-Einstrahlung nur geringe Stabilität und sind bei 20 % Laserleistung bereits vollständig dissoziiert. Die Spezies $[M+2Na]^{2+}$, $[2M+H+Na]^{2+}$ und $[3M+H+Na]^{2+}$ fragmentieren bei 30 % bis 40 % vollständig. Die Spezies $[M+H+K]^{2+}$ und $[2M+H+K]^{2+}$ zeigen höhere Stabilitäten als andere Cluster und fragmentieren erst relativ vollständig bei 60 %. Die Na⁺- und K⁺-koordinierten Spezies $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ weisen unter den beobachteten Adduktionen die höchsten Stabilitäten auf und fragmentieren erst bei Laserintensitäten von 80 % nahezu vollständig.

Harvey et al. zeigen, dass protonierte Ionen bei geringeren Anregungsenergien fragmentieren als einfach geladene Metallionen.[49] Diese Tendenz konnte auch in den PD-Experimenten beobachtet werden. Weitere Studien zeigen, dass die Stabilität der verschiedenen Alkali-Adduktionen im Allgemeinen mit der Reihenfolge $H < Li < Na <$

K zunehmen, jedoch sind auch strukturbedingte Abweichungen von dieser Abfolge bekannt.[75, 74, 76, 77] Auch bei den LNFP II-Spezies $[M+K]^+$ und $[M+Na]^+$ ist eine solche Abweichung in dem Spektrum erkennbar und die beiden Adduktionen weisen ähnliche Fragmentierungseffizienzen auf.

6.1.4 Zugabe von Alkaliionen

Den Zusammenhang zwischen den Ionenradien und der Bildung verschiedener Adduktionen wurden mit den Alkaliionen Li^+ , Rb^+ und Cs^+ untersucht. Dabei wurde eine Lösung aus $10\mu M$ LNFP II in Wasser, in der $100\mu M$ Alkalikationen gelöst waren, verwendet. Die Übersichtsspektren sind in Abb. 6.7 dargestellt.

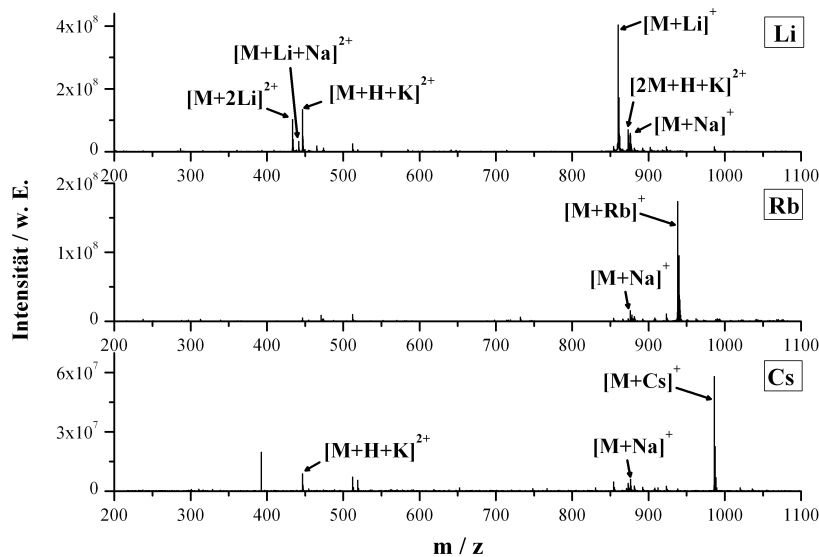


Abbildung 6.7: Übersichtsspektren mit Zugabe von Alkaliionen ($100\mu M$) zu $10\mu M$ LNFP II in H_2O .

Bei der Zugabe der relativ kleinen Lithiumionen (Koordinationszahl (KZ) 4: 73 pm; KZ 6: 90 pm) [141] werden, auch bei Variation der LNFP II- und Kationenkonzentrationen (Abb. B.6 und Abb. B.10), keine zweifach geladenen Dimere im Spektrum beobachtet. Rb^+ (KZ 6: 166 pm) und Cäsium (KZ 6: 181 pm) weisen größere ionische Radien auf als Li^+ , Na^+ (KZ 4: 113 pm; KZ 6: 116 pm) [141] oder K^+ (KZ 6: 152 pm) [141]. Bei der Zugabe von Rubidium und Cäsium wurden nur die einfach geladenen Monomere $[M+Cs]^+$ und $[M+Rb]^+$ im Spektrum beobachtet.

6.2 CID-Spektren verschiedener Alkali-Adduktionen von LNFP I und LNFP II

Alkali-Adduktionen werden zur Verbesserung des Fragmentierungsverhaltens der Oligosaccharide verwendet. Dabei werden gewöhnlich Oligosaccharidmonomere und keine dimeren Cluster verwendet.[80, 142] Im Weiteren wurde untersucht, ob die Verwendung von Dimeren, besonders der stabilen Spezies $[2M+H+K]^{2+}$, ebenfalls zu einer Verbesserung des Fragmentierungsverhaltens führt.

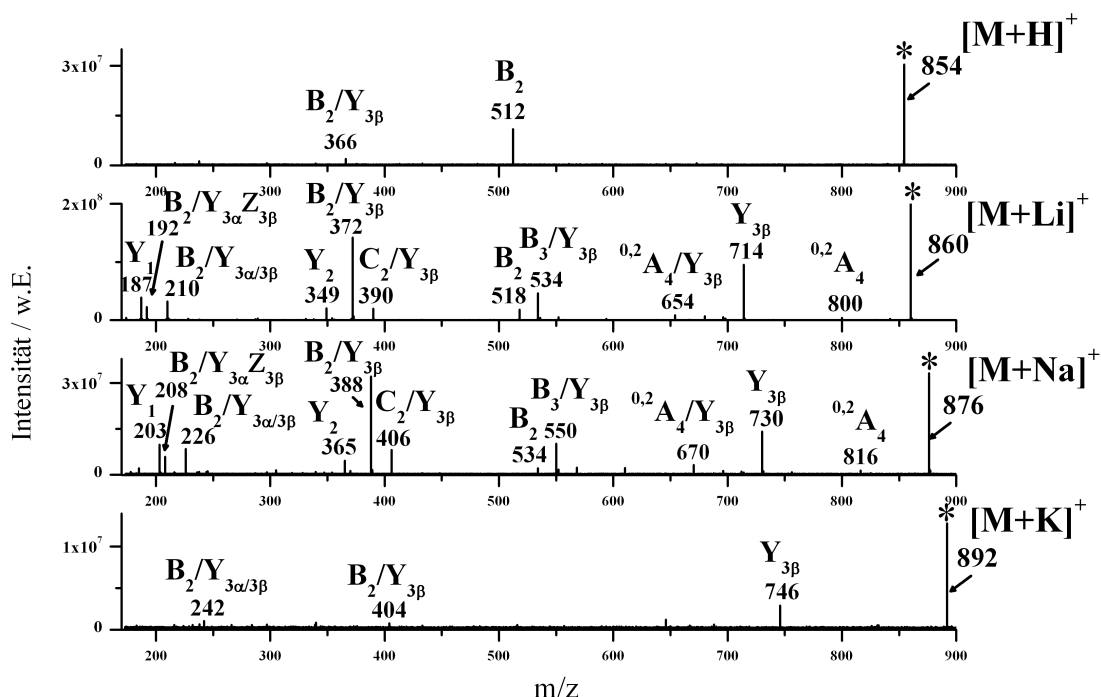


Abbildung 6.8: IRMPD-Spektren von LNFP II: (von oben) $[M+H]^+$ (m/z 854,3), $[M+Li]^+$ (m/z 860,3), $[M+Na]^+$ (876,3) und $[M+K]^+$ (892,3).

6.2.1 CID von einfach geladenen Oligosaccharid-Monomeren

Zum Vergleich der erhaltenen Dimerspektren wurden die Adduktionen $[LNFP II+H]^+$, $[LNFP II+Li]^+$, $[LNFP II+Na]^+$, $[LNFP II+K]^+$, $[LNFP II+Rb]^+$ und $[LNFP II+Cs]^+$ mittels IRMPD oder CID fragmentiert (Abb. 6.8 und Abb. 6.9).

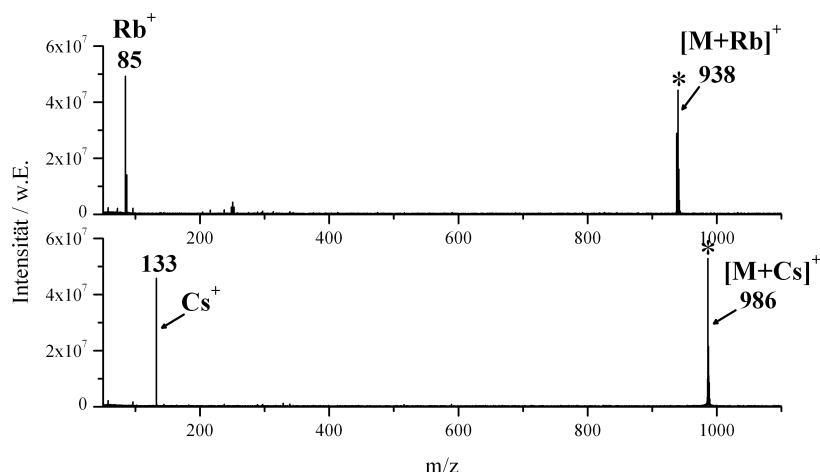


Abbildung 6.9: CID-Spektren von LNFP II: (oben) $[M+Rb]^+$ (m/z 938,3) und (unten) $[M+Cs]^+$ (m/z 986,3).

Die IRMPD des protonierten Oligosaccharids $[LNFP II+H]^+$ führt ausschließlich zu glycosidischen Bindungsbrüchen. IRMPD-Spektren von $[LNFP II+Na]^+$ und $[LNFP II+Li]^+$ weisen zahlreiche Fragmente, darunter auch Ringbruchfragmente, auf. Die Spektren dieser beiden Spezies besitzen deutliche Ähnlichkeiten, was sowohl bei LNFP I wie auch bei LNFP II bereits von *Lebrilla et al.* beobachtet wurde.[12] In den MS/MS-Spektren von $[LNFP II+K]^+$ werden nur wenige Fragmente, die ausschließlich auf glycosidische Bindungsbrüche zurückgehen, beobachtet. In den CID-Spektren von $[M+Rb]^+$ und $[M+Cs]^+$ kann nur der Verlust des Alkalimetallions beobachtet werden. Neben diesen Alkaliionen werden keine weiteren Fragmentationen gebildet.

6.2.2 CID von zweifach geladenen Oligosaccharid-Dimeren

Im folgenden Abschnitt werden die CID-Spektren der Dimere $[2LNFP II+H+Na]^{2+}$ und $[2LNFP II+H+K]^{2+}$ diskutiert.

CID von $[2LNFP II+H+Na]^{2+}$

Das CID-Spektrum des Dimers $[2LNFP II+H+Na]^{2+}$ (Abb. 6.10 auf der nächsten Seite) weist nur wenige Fragmente auf. Dabei handelt es sich ausschließlich um einfach geladene Ionen, die aus LNFP II gebildet werden. Die Fragmente liegen protoniert oder als Na-Adduktionen vor.

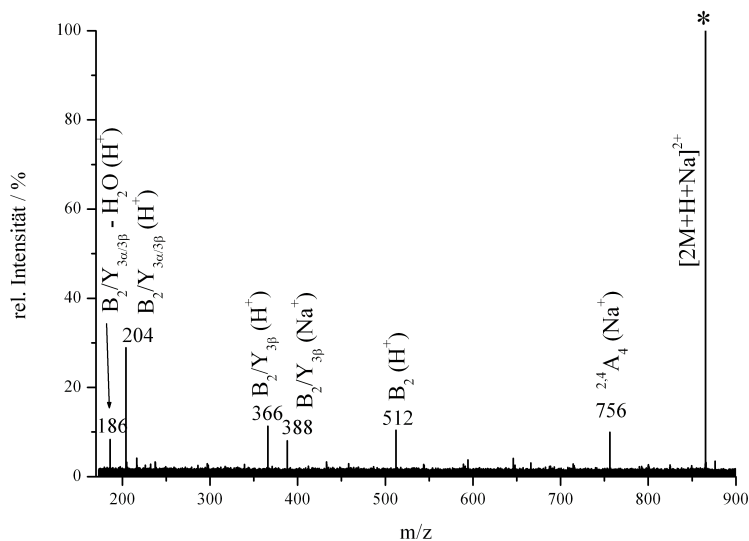


Abbildung 6.10: CID-Spektrum von $[2LNFPII+H+Na]^{2+}$ (m/z 865,3).

Bei den Fragmenten handelt es sich um die protonierten Ionen B_2 (m/z 512,2), $B_2/Y_{3\beta}$ (m/z 366,1), $B_2/Y_{3\alpha/3\beta}$ (m/z 204,1) und $B_2/Y_{3\alpha/3\beta}-H_2O$ (m/z 186,1). Die Fragmente B_2 und $B_2/Y_{3\alpha/3\beta}$ sind auch in den Fragmentspektren der Spezies $[LNFPII+H]^+$ zu erkennen (Abb. 6.8), wohingegen die Fragmente $B_2/Y_{3\alpha/3\beta}$ und $B_2/Y_{3\alpha/3\beta}-H_2O$ dort nicht, oder nur in sehr geringer Intensität, zu beobachten sind. Des Weiteren werden zwei Na-Adduktionen gebildet. Dabei handelt es sich um das innere Fragment $B_2/Y_{3\beta}$, welches auch in dem MS/MS-Spektrum der Spezies $[M+Na]^+$ in hoher Intensität zu finden ist (Abb. 6.8). Das andere Na-Adduktssignal wird durch das Fragment $^{0,2}A_4$ bei m/z 756,2 verursacht. Dieses Signal ist ebenfalls, wenn auch mit geringer Intensität, bei $[M+Na]^+$ zu beobachten.

CID von $[2LNFPI+H+K]^{2+}$ und $[2LNFPII+H+K]^{2+}$

Die Ionen $[2LNFPI+H+K]^{2+}$ und $[2LNFPII+H+K]^{2+}$ zeigen bei MS/MS-Experimenten ein ungewöhnliches Fragmentierungsverhalten. Die Spektren weisen eine große Anzahl an Signalen auf (Abb. 6.11). Damit unterscheiden sie sich erheblich von denen der Monomere $[LNFPII+H]^+$ und $[LNFPII+K]^+$ (Abb. 6.8).

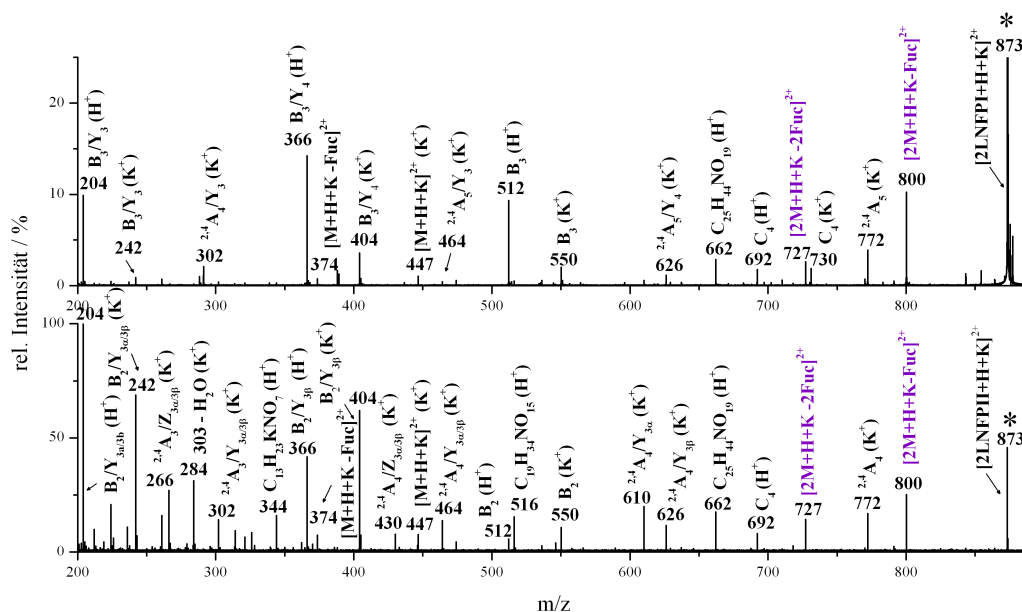


Abbildung 6.11: CID-Spektren von (oben) $[2\text{LNFP I} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ und (unten) $[2\text{LNFP II} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ (beide m/z 876,3). Die beobachteten Dimerfragmente sind violett dargestellt.

Es entstehen zahlreiche protonierte Fragmente und K-Adduktfragmente. Die Ionen-signale der Spektren sind in Tab. B.1 aufgelistet und zugeordnet und in Abb. 6.12 graphisch dargestellt. Besonders überraschend ist die Anwesenheit von zweifachgeladenen Fragmenten, welche aus zwei Oligosaccharidmolekülen gebildet werden, sogenannte Dimerfragmente. Von diesen Dimeren werden lediglich eine oder zwei Fucosen eliminiert. Zu diesen Fragmenten gehören $[2\text{M} + \text{H} + \text{K} - \text{Fuc}]^{2+}$ (m/z 800,3) und $[2\text{M} + \text{H} + \text{K} - 2\text{Fuc}]^{2+}$ (m/z 727,2) ($\text{M} = \text{LNFP I}$ oder LNFP II). Weitere zweifach geladene Fragmente sind die Monomere $[\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ (m/z 446,6) und die Fragmente $[\text{M} + \text{H} + \text{K} - \text{Fuc}]^{2+}$ (m/z 373,6). Die protonierten Fragmente sind ausschließlich auf glycosidische Bindungsbrüche zurückzuführen, wohingegen bei den K-Adduktfragmenten auch $^{2,4}\text{A}$ -Ionen entstehen. Diese Ringbruchfragmente sind ungewöhnlich, da sie bei monomeren K-Adduktionen nicht beobachtet werden. Weder die monomeren K-Adduktionen noch die protonierten Spezies verursachen bei der Fragmentierung isomerenspezifische Signale. In den Spektren der Dimere sind jedoch mehrere dieser isomerenspezifischen Fragmente zu beobachten, mit deren Hilfe auch eine Unterscheidung von LNFP I und II möglich ist.

Die Eliminierung der Galactose ohne vorherigen Verlust der Fucose und die gleichzeiti-

ge $Z_{3\alpha}$ und $Z_{3\beta}$ -Fragmentierung an der GlcNAc-Einheit resultiert in spezifische LNFP II-Fragmente. In dem Spektrum der LNFP I ist das K-Adduktfragment C_4 (m/z 730,2) zu beobachten, welches nicht bei LNFP II gebildet wird.

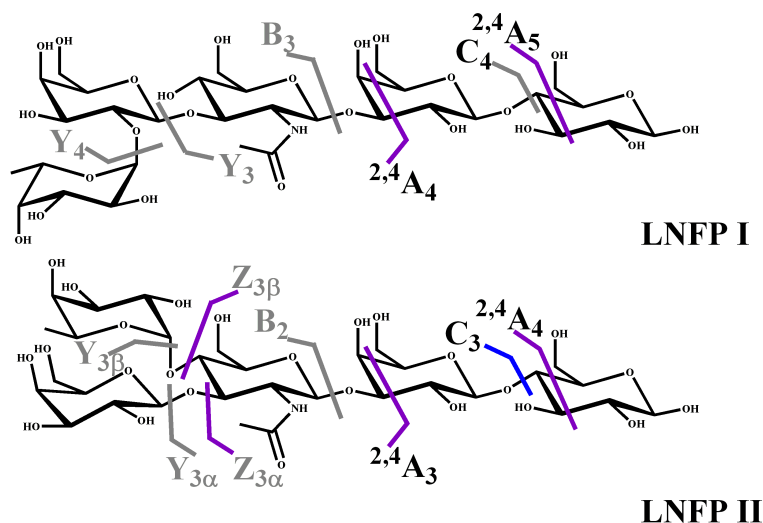


Abbildung 6.12: Fragmente von $[2\text{LNFP I} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ und $[2\text{LNFP II} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ (violett: Kalium-Adduktfragmente, blau: protonierte Fragmente, grau: Fragmente, die protoniert und als Kalium-Adduktion auftreten).

6.2.3 CID von $[3\text{LNFP II} + 2\text{Na}]^{2+}$ und $[3\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$

Die Trimere $[3\text{M} + 2\text{Na}]^{2+}$ und $[3\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ werden, anders als die Trimere $[3\text{M} + \text{H} + \text{Na}]^{2+}$ und $[3\text{M} + \text{Na} + \text{K}]^{2+}$, in ausreichender Intensität gebildet, um CID-Experimente durchzuführen. Die Fragmentspektren zeigen nur wenige Signale. Das Trimer $[3\text{LNFP II} + 2\text{Na}]^{2+}$ (Abb. 6.13) bildet mit hoher Intensität das Monomer $[\text{LNFP II} + \text{Na}]^+$ und wenige Fragmente, die ausschließlich durch glycosidische Bindungsbrüche entstehen und auch bei dem Monomer $[\text{LNFP II} + \text{Na}]^+$ zu beobachten sind (Abb. 6.8). Die Trimere $[3\text{LNFP I} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$, $[3\text{LNFP II} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ zeigen ein anderes Fragmentierungsverhalten (Abb. 6.14). Es sind keine Monomere, weder die Spezies $[\text{M} + \text{H}]^+$ noch $[\text{M} + \text{K}]^+$ (Abb. 6.8), zu erkennen. Stattdessen ist die Eliminierung jeweils eines Oligosaccharids zu beobachten. Dies führt zu den bereits bekannten jeweiligen Dimeren $[2\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ (m/z 873,3) und ist ein weiterer Hinweis für die auffällige Stabilität dieser Spezies. In dem CID-Spektrum des $[3\text{LNFP I} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$, bei dem bessere Signalintensitäten erreicht wurden, sind sogar die Dimerfragmente $[2\text{M} + \text{H} + \text{K} - \text{Fuc}]^{2+}$ (m/z 800,3) und $[2\text{M} + \text{H} + \text{K} - 2\text{Fuc}]^{2+}$ (m/z 727,2) zu beobachten.

6.2 CID-Spektren verschiedener Alkali-Adduktionen von LNFPI und LNFPII

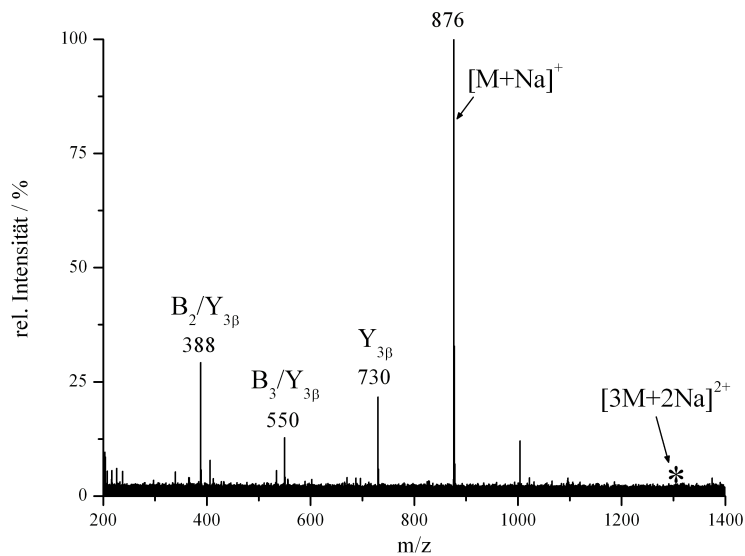


Abbildung 6.13: CID-Spektrum von $[3LNFPII+2Na]^{2+}$ (m/z 1302,9).

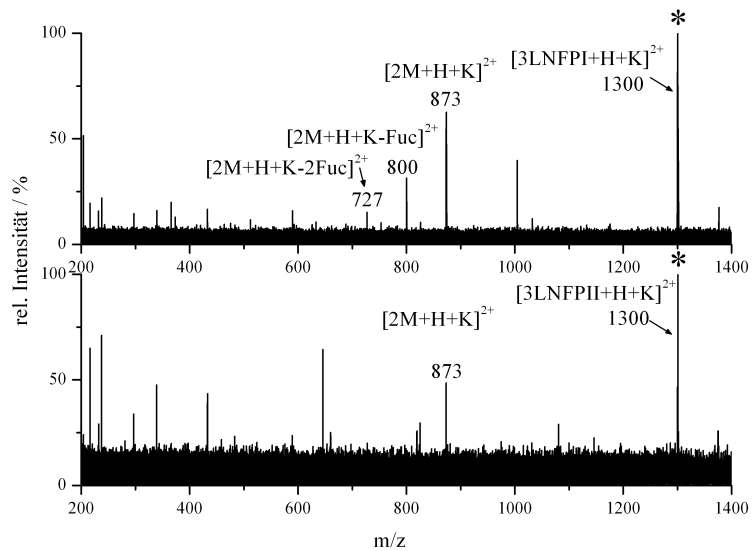


Abbildung 6.14: IRMPD-Spektren von (oben) $[3LNFPI+H+K]^{2+}$ und (unten) $[3LNFPII+H+K]^{2+}$ (beide m/z 1299,9).

6.3 Bildung und Fragmentierung von weiteren dimeren Clustern

Weitere Ionen, die ähnliche Ionenradien wie K^+ besitzen, wurden als Additive eingesetzt. Es sollte dabei untersucht werden, ob die Bildung weiterer stabiler Cluster beobachtet werden kann. Dazu wurden sowohl einwertige Ammoniumionen (164 pm) wie auch die divalenten Strontium- (132 pm) und Bariumionen (149 pm) zugegeben, wobei Wasser wieder als ESI-Lösungsmittel verwendet wurde.

Bei Zugabe von NH_4^+ wurde die Bildung der Dimere $[2M+H+NH_4]^{2+}$ (m/z 862,8) in geringer Intensität beobachtet (Abb. B.9). Bei Zugabe von Sr^{2+} und Ba^{2+} werden die monomeren Spezies $[M+Sr]^{2+}$ (m/z 470,6) und $[M+Ba]^{2+}$ (m/z 495,6) gebildet. Die Übersichtsspektren befinden sich im Anhang (Abb. B.11). In geringerer Intensität werden die Oligosacchariddimere $[2M+Sr]^{2+}$ (m/z 898,3) und $[2M+Ba]^{2+}$ (m/z 922,3) gebildet.

6.3.1 IMRPD von $[2LNFPII+H+NH_4]^{2+}$

In den IMRPD-Spektren von $[2LNFPII+NH_4]^{2+}$ (m/z 862,8) können nur wenige, ausschließlich einfach geladene, protonierte Fragmente beobachtet werden (Abb. 6.15). Dabei handelt es sich um die protonierten Ionen B_2 (m/z 512,2), $B_2/Y_{3\beta}$ (m/z 366,1) und $B_2/Y_{3\alpha/3\beta}$ (m/z 204,1), die durch glycosidische Bindungsbrüche entstehen. Alle diese Fragmente sind auch in den CID-Spektren der Monomere $[M+H]^+$ (Abb. 6.8) und $[M+NH_4]^+$ (Abb. B.8) zu beobachten. Es werden keine Dimerfragmente gebildet.

6.3.2 CID von $[2LNFPI+Sr]^{2+}$ $[2LNFPII+Sr]^{2+}$

Die CID-Spektren von $[2LNFPI+Sr]^{2+}$ und $[2LNFPII+Sr]^{2+}$ (Abb. 6.16) weisen eine große Anzahl von Signalen auf, die im Anhang in Tabelle B.3 aufgelistet und in Abb. 6.17 graphisch dargestellt sind.

Ähnlich wie bei der Spezies $[2M+H+K]^{2+}$ werden die Dimerfragmente $[2M+Sr-Fuc]^{2+}$ (m/z 824,2) und $[2M+Sr-2Fuc]^{2+}$ (m/z 751,2) gebildet. Weitere zweifach geladene Strukturen sind die Monomere $[M+Sr]^{2+}$ (m/z 470,6) und die Strontium-Adduktionen Y_4 (LNFPI) bzw. $Y_{3\beta}$ (LNFP II) bei m/z 397,6. Diese entstehen durch die Eliminierung der Fucose. Zusätzlich werden protonierte Fragmente und einfach geladene Sr-Adduktionen des Typs $[F+Sr-H]^+$ beobachtet (F = Fragment). Die protonierten Fragmente sind ausschließlich auf glycosidische Bindungsbrüche zurückzuführen. Unter den einfach geladenen Sr-Adduktionen werden $^{2,4}A$ -Ringbrüche beobachtet. Diese Ringbrüche finden

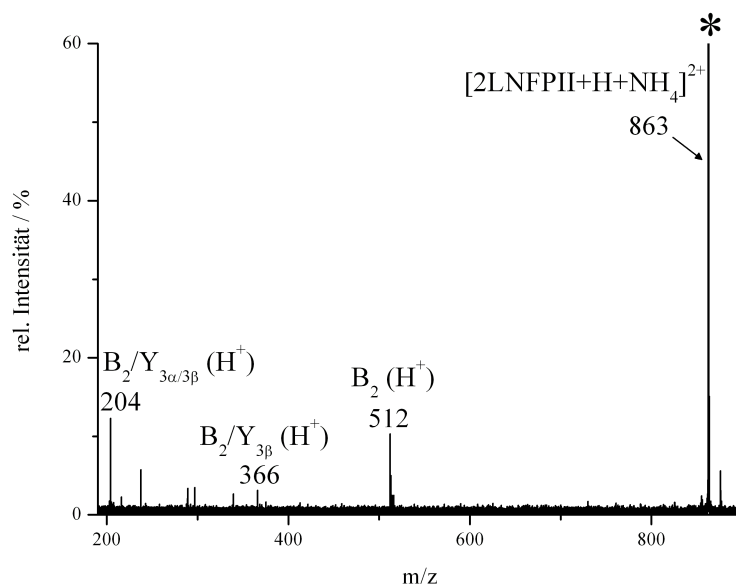


Abbildung 6.15: IRMPD-Spektrum von [2LNFPII+H+NH₄]²⁺ (m/z 862,8 m/z).

auch bei den Spezies [2M+H+K]²⁺ statt (Abb. 6.12). Die Sr-Adduktfragmente des Typs [F+Sr-H]⁺ bei m/z 658,1, welches wahrscheinlich ein ^{2,4}A₄/Y_{3α}-Fragment darstellt, und das Signal bei m/z 478,0 (Z_{3α/3β}) sind nur in den CID-Spektren der LNFP II zu beobachten, nicht bei der LNFP I. Eine Unterscheidung der Isomere ist anhand dieser Signale möglich.

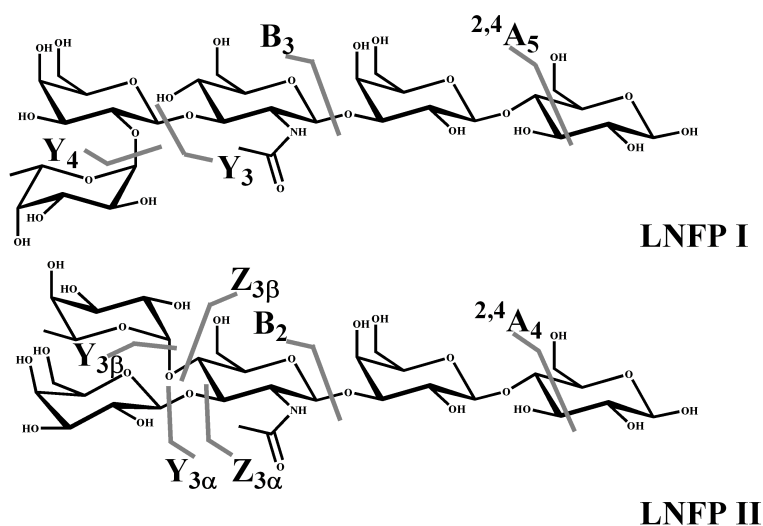


Abbildung 6.17: Fragmente von [2LNFPI+Sr]²⁺ und [2LNFPII+Sr]²⁺.

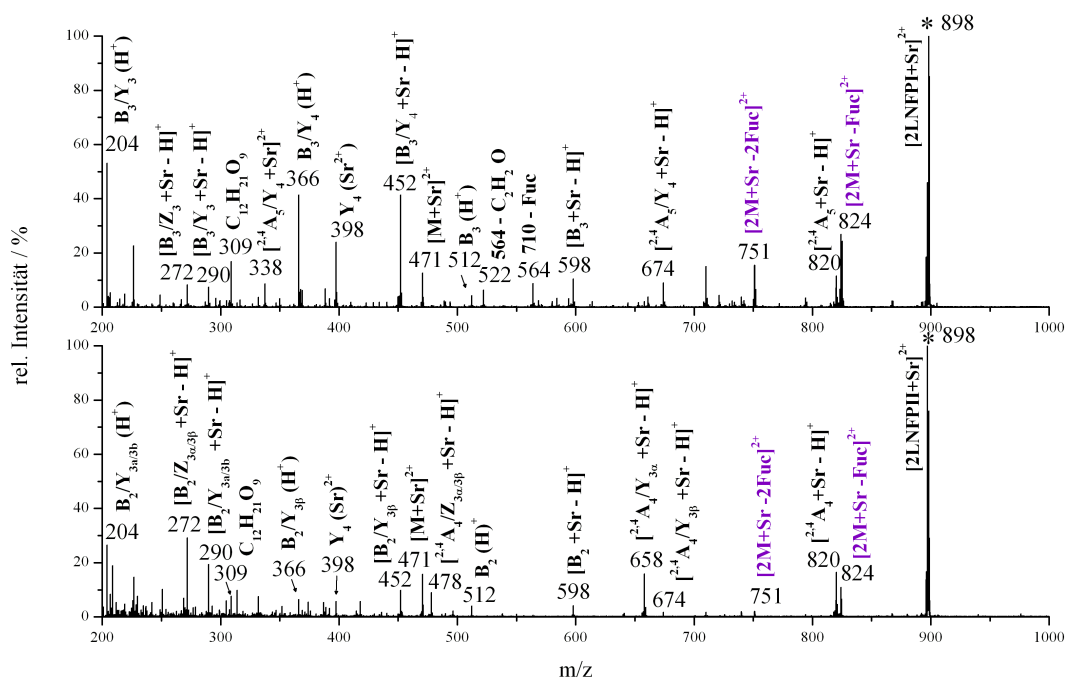


Abbildung 6.16: CID-Spektren von (oben) $[2\text{LNFPI}+\text{Sr}]^{2+}$ und (unten) $[2\text{LNFPII}+\text{Sr}]^{2+}$ (beide m/z 898,3). Die beobachteten Dimerfragmente sind violett dargestellt.

6.3.3 CID von $[2\text{LNFPI}+\text{Ba}]^{2+}$ und $[2\text{LNFPII}+\text{Ba}]^{2+}$

Bei der CID von $[2\text{LNFPI}+\text{Ba}]^{2+}$ und $[2\text{LNFPII}+\text{Ba}]^{2+}$ (Abb. 6.18) wird ein ähnliches Fragmentierungsmuster beobachtet, wie bei den vergleichbaren Sr-Adduktionen. Eine Zuordnung der Signale befindet sich in Tab. B.4 und eine graphische Darstellung in Abb. 6.19.

Auch bei diesen Spezies werden die Dimerfragmente $[2\text{M}+\text{Ba}-\text{Fuc}]^{2+}$ (m/z 849,2) und $[2\text{M}+\text{Ba}-2\text{Fuc}]^{2+}$ (m/z 776,2) gebildet. Bei m/z 495,6 werden die zweifach geladenen Monomere $[\text{M}+\text{Ba}]^{2+}$ und bei m/z 422,6 die Ba-Adduktionen $\text{Y}_4(\text{LNFPI})$ bzw. $\text{Y}_{3\beta}(\text{LNFPII})$ beobachtet. Zusätzlich werden protonierte Fragmente und Ba-Adduktionen des Typs $[\text{F}+\text{Ba}-\text{H}]^+$ gebildet. Die protonierten Fragmente sind nur auf glycosidische Bindungsbrüche zurückzuführen, wohingegen die einfach geladenen Strontiumionen auch $^{2,4}\text{A}$ -Ionen beinhalten. Die Unterscheidung der Isomere ist anhand verschiedener Signale möglich (Tab. B.4).

6.3 Bildung und Fragmentierung von weiteren dimeren Clustern

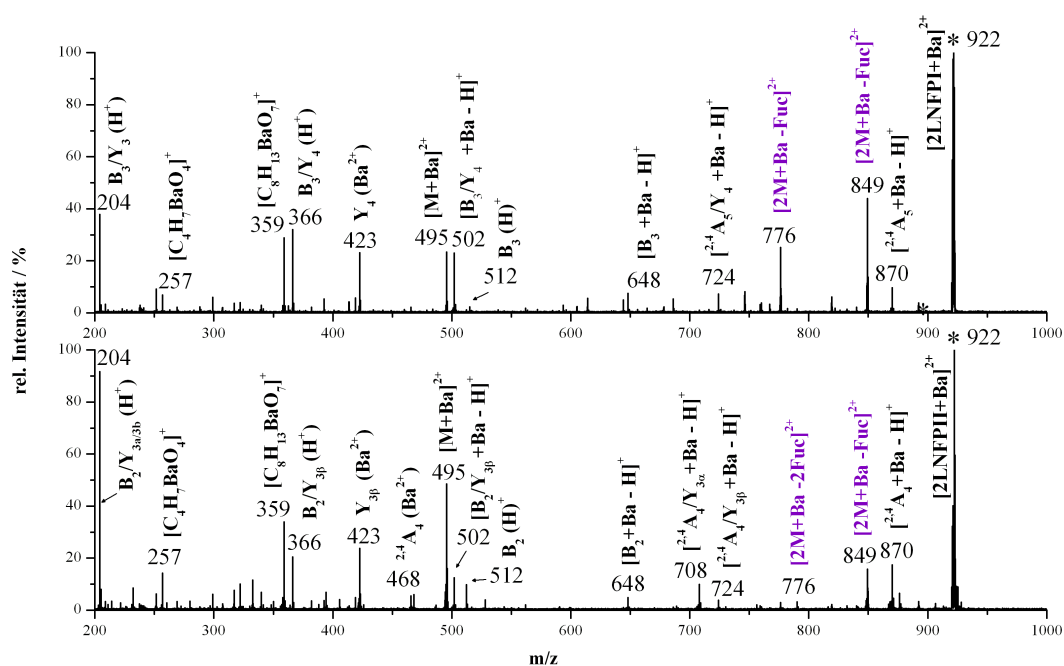


Abbildung 6.18: CID-Spektren von (oben) $[2\text{LNFPI}+\text{Ba}]^{2+}$ und (unten) $[2\text{LNFPII}+\text{Ba}]^{2+}$ (beide m/z 922,3). Die beobachteten Dimerfragmente sind violett dargestellt.

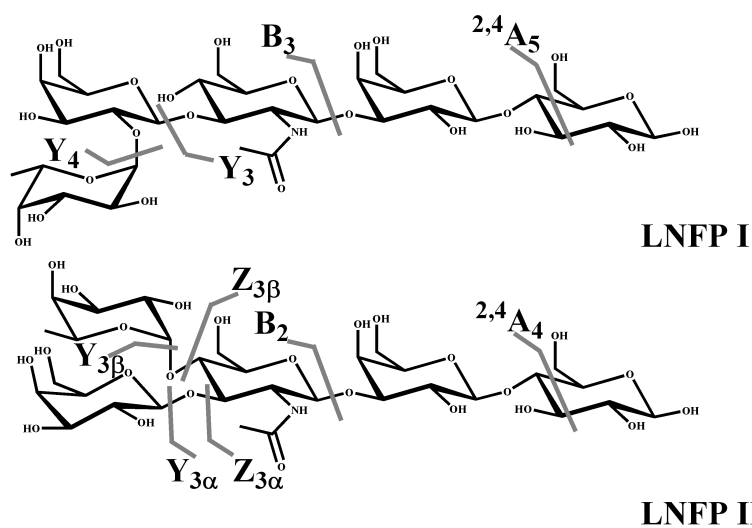


Abbildung 6.19: Fragmente von $[2\text{LNFPI}+\text{Ba}]^{2+}$ und $[2\text{LNFPII}+\text{Ba}]^{2+}$.

6.3.4 CID von $[3\text{LNFP I}+\text{Sr}]^{2+}$ und $[3\text{LNFP I}+\text{Ba}]^{2+}$

$[3\text{LNFP I}+\text{Sr}]^{2+}$ (m/z 1323,9) und $[3\text{LNFP I}+\text{Ba}]^{2+}$ (m/z 1348,9) (Abb. 6.20) weisen bei der CID ähnliche Bindungsbrüche wie die Spezies $[3\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ auf (Abb. 6.14).

Die Dimere $[2\text{LNFP I}+\text{Sr}]^{2+}$ (m/z 898,3) und $[2\text{LNFP I}+\text{Ba}]^{2+}$ (m/z 922,3) werden mit hohen Intensitäten gebildet. Auch die Dimere mit dem zusätzlichen Verlust einer und zwei Fucose-Einheiten ist zu beobachten. Die monomeren Spezies $[\text{M}+\text{Sr}]^{2+}$ (m/z 470,6) und $[\text{M}+\text{Ba}]^{2+}$ (m/z 495,6) sind nur mit geringen Intensitäten (unter 15 %) vorhanden.

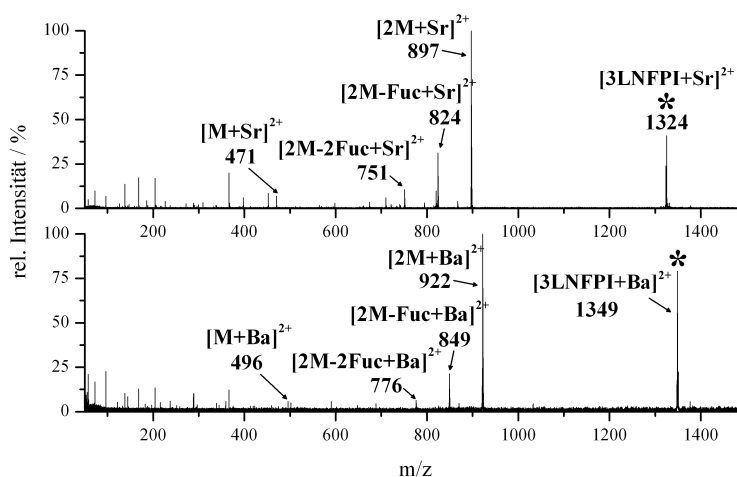


Abbildung 6.20: CID-Spektren von (oben) $[3\text{LNFP I}+\text{Sr}]^{2+}$ (m/z 1324) und (unten) $[3\text{LNFP I}+\text{Ba}]^{2+}$ (m/z 1349).

6.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Bildung der verschiedenen Alkali-, Ammonium- und Erdalkali-Adduktionen

Saccharide sind als Polyhydroxyverbindungen sehr gut geeignet, Metallionen zu komplexieren. Auch die funktionellen Gruppen eines Saccharids, wie die N-Acetylgruppe bei der LNFP I und der LNFP II, sind an der Komplexbildung der Metalle beteiligt.

Unter Verwendung von Wasser als ESI-Lösungsmittel wurden verschiedene Adduktionen von LNFP I und LNFP II beobachtet. Dazu gehören die Oligosacchariddimere $[2\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ und $[2\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ und die Saccharidtrimere $[3\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, $[3\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ und $[3\text{M}+\text{Na}+\text{K}]^{2+}$ ($\text{M} = \text{LNFP I oder LNFP II}$). Insbesondere die Spezies $[2\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$

fällt durch ihre hohe Signalintensität auf und besitzt teilweise ähnliche Intensitäten wie das Adduktion $[M+Na]^{2+}$.

LNFP I und LNFP II sind häufig verwendete Oligosaccharidanalyte. In der Literatur wurden, je nach Ionisationsart und verwendetem Massenspektrometer, verschiedene Adduktionen in den Spektren beobachtet. *Pikulski et al.* zeigen mit einem LCQ Deca XP-MS [117], dass bei der ESI im positiven Ionenmodus fast ausschließlich die Na-Adduktionen von LNFP I und LNFP II gebildet werden. Dahingegen waren bei der NanoESI unter Verwendung eines differentiellen Mobilitätsspektrometers (nanoESI-DMS-MS) die intensivsten Adduktionen von LNFP I und LNFP II die Spezies $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$. Weiterhin wurden die Cluster $[2M+NH_4]^+$, $[2M+Na]^+$, $[5M+2NH_4]^{2+}$, $[5M+NH_4+Na]^{2+}$, $[3M+NH_4]^+$, $[3M+Na]^+$ und $[10M+3NH_4]^+$ gebildet.[54] Die Bildung der Cluster und die Signalintensitäten der verschiedenen Spezies können von vielen Faktoren abhängen. Dazu gehören neben der Struktur der Saccharide auch deren Konzentrationen (Abb. B.10), die Konzentration der Kationen [53, 52] (Abb. B.6), die Koordinationszahl der Ionen [57], die Stabilität der Komplexe, das Lösungsmittel [54], die an der Kapillare und dem Sprayschirm angelegten Spannungen, der Druck in der Quelle und im Massenspektrometer sowie weitere experimentelle Parameter.[49]

Die durchgeführten ESI-Experimente, bei denen verschiedene Lösungsmittel verwendet wurden, haben gezeigt, dass die Verwendung von Wasser als ESI-Lösungsmittel zu einer intensiven Clusterbildung führt (siehe Abschn. 6.1.1). Die Coulomb-Abstoßung zwischen zwei Metallionen oder einem Metallion und einem Proton beeinflusst den Bindungsort und die Stabilität der Adduktionen. In einer polaren (wässrigen) Lösung können die Ladungen besser abgeschirmt werden als in einer unpolaren Lösung. Die Solvatmoleküle ermöglichen daher eine räumliche Annäherung zweier Kationen.[143]

Im Allgemeinen nimmt die Kationenaffinität von Oligosacchariden bei Alkaliionen in der Reihenfolge $Li^+ > Na^+ > K^+$ ab.[80] Es ist daher überraschend, dass unter den gewählten Bedingungen die Spezies $[xM+H+K]^{2+}$ ($x = 1-3$) die intensivsten zweifach geladenen Monomer-, Dimer- und Trimersignale von LNFP I und LNFP II darstellen und nicht die jeweiligen $[xM+H+Na]^{2+}$ -Cluster. *Liou et al.* zeigen jedoch, dass die Alkalifaffinität bei verschiedenen Kronenethern abhängig von deren dreidimensionaler Struktur und der Anzahl der möglichen Donoratome ist.[144] Um eine optimale Koordination des Metalls zu erreichen, ändert das Saccharid seine Konformation.[145] Die Ionengröße des Metalls besitzt somit einen deutlichen Effekt auf die Struktur und die Bildung der Adduktionen sowie deren Fragmentierung.

Allgemein wird angenommen, dass die Li^+ -Ionen und die Na^+ -Ionen ähnlich an Oli-

gosaccharide binden.[13, 77, 49] Auch die Fragmentspektren dieser Adduktionen weisen große Ähnlichkeiten auf (Abb. 6.8). Unter Verwendung der relativ kleinen Li^+ -Ionen kann die Bildung von dimeren Clustern nicht beobachtet werden. Wahrscheinlich besitzt die Bindung des Li^+ zu dem Saccharid einen zu hohen kovalenten Charakter. Auch bei Zugabe von Rb^+ und Cs^+ wird die Bildung der Dimere nicht beobachtet.

Bei der Verwendung von Ionen, die ähnliche Radien besitzen wie K^+ , findet die Bildung von dimeren Clustern statt. Die Ionengröße der verwendeten Metalle sind in Tab. 6.1 dargestellt. Des Weiteren wird aus der Tabelle ersichtlich, ob eine Dimerbildung stattfindet und ob in den MS/MS-Spektren Dimerfragmente gebildet werden. Als Additive wurden sowohl einwertige NH_4^+ -Ionen wie auch die zweiwertigen Ionen Sr^{2+} und Ba^{2+} verwendet. Die gebildeten Dimere waren dabei die Spezies $[\text{2M+H+NH}_4]^{2+}$, $[\text{2M+Sr}]^{2+}$ und $[\text{2M+Ba}]^{2+}$. Die Bildung der Dimere wurde bei Kationenradien zwischen 113 pm und 164 pm beobachtet.

Tabelle 6.1: Übersicht über die verwendeten Adduktionen, die entsprechenden Ionenradien bei einer Koordinationszahl von 4 oder 6, die gebildeten Dimere und die Bildung von Dimerfragmenten bei der CID.

Adduktion	Ionenradius /pm (KZ 4)[141]	Ionenradius /pm (KZ 6)[141]	Dimere	Dimerfragment
Li^+	73	90	-	-
Na^+	113	116	$[\text{2M+H+Na}]^{2+}$	-
Sr^{2+}		132	$[\text{2M+Sr}]^{2+}$	✓
Ba^{2+}		149	$[\text{2M+Ba}]^{2+}$	✓
K^+	151	152	$[\text{2M+H+K}]^{2+}$	✓
NH_4^+		164	$[\text{2M+H+NH}_4]^{2+}$	-
Rb^+		166	-	-
Cs^+		181	-	-

Fragmentierung der Oligosacchariddimere und Oligosaccharidtrimere

Bei verschiedenen Oligosacchariden wurde mit der CID bis zur vollständigen Fragmentierung der Spezies $[\text{M+Na}]^+$ die vierfache Energie benötigt wie bei der protonierten Spezies $[\text{M+H}]^+$. [49] Auch bei der IRMPD von LNFP II wird bis zur vollständigen Fragmentierung der $[\text{M+Na}]^+$ -Ionen von LNFP II ungefähr die vierfache Laserintensität benötigt wie bei den protonierten Ionen (Abb. 6.6). Bei der dimeren Spezies $[\text{2M+H+K}]^{2+}$ wird eine höhere Stabilität beobachtet als bei der protonierten Spezies oder dem Dimer

$[2M+H+Na]^{2+}$. Zur vollständigen Fragmentierung der $[2M+H+K]^{2+}$ -Ionen wurde, im Vergleich mit den protonierten, die dreifache Laserleistung verwendet.

Neben dieser Stabilität überrascht ebenfalls die Signalvielfalt der CID-Spektren von $[2LNFPI+H+K]^{2+}$ und $[2LNFPI+H+K]^{2+}$. Bemerkenswert sind insbesondere die Dimerfragmente, welche aus zwei Oligosacchariden bestehen, von denen jeweils nur eine oder zwei Fucose-Einheiten eliminiert wurden.

Die Spezies $[2M+H+Na]^{2+}$, $[2M+H+NH_4]^{2+}$, $[2M+Sr]^{2+}$ und $[2M+Ba]^{2+}$ wurden ebenfalls fragmentiert, aber nur bei $[2M+Sr]^{2+}$ und $[2M+Ba]^{2+}$ konnten Dimerfragmente beobachtet werden. Das Auftreten dieser Fragmente korreliert mit der Ionengröße der Metallionen und wird bei Ionenradien zwischen 132 pm und 152 pm beobachtet (Tab. 6.1).

Ein weiterer Hinweis für die Stabilität der Dimere $[2M+H+K]^{2+}$, $[2M+Sr]^{2+}$ und $[2M+Ba]^{2+}$ ist in den Fragmentspektren der jeweiligen Trimere zu finden. Diese Trimere fragmentieren ebenfalls unter Bildung der jeweiligen Dimere und Dimerfragmente. Die Struktur der Dimere ist bislang nicht bekannt. Die Adduktfragmente beinhalten das GlcNAc, was für eine Koordinierung an diese Einheiten spricht.

Die Fragmentspektren von $[2M+H+Na]^{2+}$ und $[2M+H+NH_4]^{2+}$ weisen nur wenige Signale auf, wohingegen bei $[2M+H+K]^{2+}$, $[2M+Sr]^{2+}$ und $[2M+Ba]^{2+}$ eine große Anzahl von Fragmenten gebildet werden. Es werden sowohl zweifach geladene Adduktionen, protonierte Ionen wie auch K-Adduktionen gebildet, bzw. einfach geladene Erdalkali-Adduktionen des Typs $[F+Sr-H]^+$ oder $[F+Ba-H]^+$. Insgesamt weisen die CID-Spektren der Spezies $[2M+Sr]^{2+}$, $[2M+Ba]^{2+}$ und $[2M+H+K]^{2+}$ Ähnlichkeiten auf, wie z.B. verschiedene $^{2,4}A$ -Ringbruchfragmente. Die Fragmentspektren der Spezies $[2M+H+K]^{2+}$ unterscheiden sich jedoch in einigen Punkten von denen der Erdalkalispezies, so besitzen die K-Adduktionen in den Spektren eine größere Signalvielfalt.

Bei der Fragmentierung der protonierten Isomere LNFPI und LNFP II, der Spezies $[M+K]^+$ oder der Dimere $[2M+H+Na]^{2+}$ und $[2M+H+NH_4]^{2+}$ ist eine Unterscheidung der Oligosaccharide nicht möglich. Die Isomere können aber anhand der isomerenspezifischen Fragmente der Spezies $[2M+H+K]^{2+}$, $[2M+Sr]^{2+}$ und $[2M+Ba]^{2+}$ unterschieden werden.

7 Kapitel 7

VisPD der Alkali-Adduktionen

Adduktionen weisen bei der CID ein anderes Fragmentierungsverhalten auf als die protonierten Oligosaccharide (siehe Abschn. 3.2.2). Die Spektren der Adduktionen besitzen meist eine größere Anzahl an Signalen und bieten damit mehr strukturelle Informationen. Unter Verwendung von Li- und Na-Adduktionen werden bei den Isomeren LNFP I und LNFP II Fragmente beobachtet, die durch Ringbrüche verursacht werden. Die CID-Spektren von zweifach geladenen Spezies, wie z.B. $[2\text{LNFP I} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ und $[2\text{LNFP II} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$, weisen ebenfalls zahlreiche Signale auf, die weder bei den protonierten Spezies noch bei den K-Adduktionen der Monomere beobachtet werden können. Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, dass auch die VisPD und CID der Adduktionen von LNFP I-Rh110 und LNFP II-Rh110 zu signalreichen Spektren führt, in denen isomerenspezifische Fragmente zu erkennen sind.

7.1 Bildung der Adduktionen bei LNFP I-Rhodamin 110

In den Massenspektren des Derivats LNFP I-Rh110 besitzen die protonierten Spezies $[\text{M} + \text{H}]^+$ die höchste Intensität (Abb. 7.1, oben links), dabei wurde Wasser:Methanol (1:1, v/v) als ESI-Lösungsmittel verwendet. Das Na-Adduktion $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (m/z 1190,4) weist nur eine sehr geringe Intensität (5 %) auf. Ein weiteres Signal bei m/z 595,7 wird durch das zweifach geladene Ion $[\text{M} + \text{H} + \text{Na}]^{2+}$ verursacht. Unter Zugabe von Li^+ zur ESI-Lösung erscheinen zusätzliche Signale von $[\text{M} + \text{H} + \text{Li}]^{2+}$ (m/z 587,7) und $[\text{M} + 2\text{Li}]^{2+}$ (m/z 590,7) (Abb. 7.1, oben rechts).

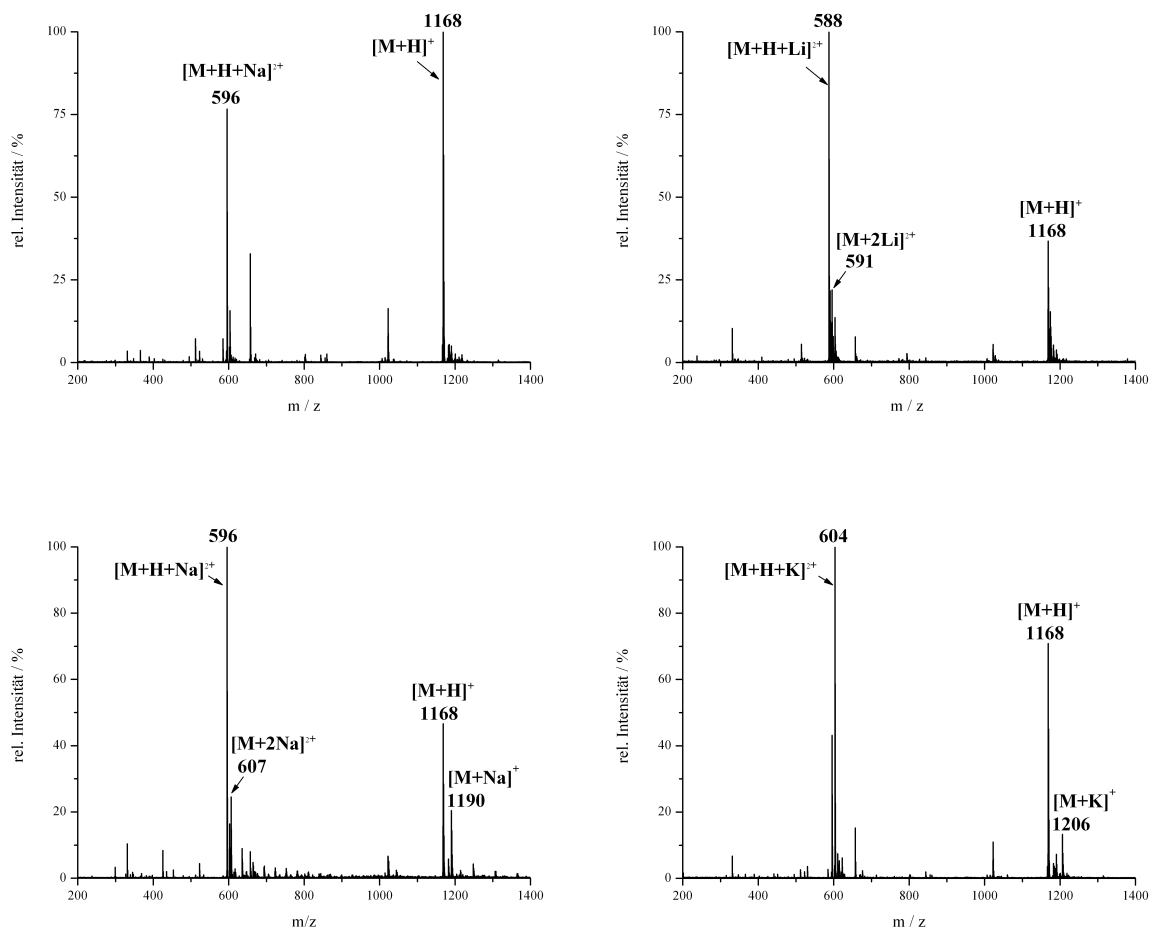


Abbildung 7.1: LNFP I-Rh110 ohne Zugabe von Additiven (oben links), mit Zugabe von Li^+ (oben rechts), mit Zugabe von Na^+ (unten links) und mit Zugabe von K^+ (unten rechts); alle Additive wurden in Konzentrationen von $10\text{ }\mu\text{M}$ verwendet.

Die einfach geladenen Monomere $[\text{M}+\text{Li}]^+$ werden nur in sehr geringem Ausmaß gebildet. Bei der Zugabe von Na^+ werden die einfach geladenen Monomere $[\text{M}+\text{Na}]^+$ und die zweifach geladenen Monomere $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ in höherer Intensität gebildet (Abb. 7.1, unten links). Zusätzlich sind die zweifach geladenen Monomere $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ (m/z 607,7) zu beobachten. Unter Zugabe von K^+ bildet sich in geringer Intensität das einfach geladene Monomer $[\text{M}+\text{K}]^+$ (m/z 1206,4), während das zweifach geladene Monomer $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ ($603,7\text{ }m/z$) in hoher Intensität zu beobachten ist (Abb. 7.1, unten rechts).

7.2 VisPD und CID der Adduktionen von LNFP I-Rh110 und LNFP II-Rh110

Die verschiedenen Adduktionen von LNFP I-Rh110 und LNFP II-Rh110 wurden mittels VisPD und CID fragmentiert. Dabei handelt es sich um die Spezies $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+H+Li]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+2Na]^{2+}$ und $[M+H+K]^{2+}$.

7.2.1 VisPD und CID der einfach geladenen Monomere

$[M+Na]^+$

Die geringe Intensität der Na-Adduktionen (20 %) im Vergleich zu den protonierten oder der zweifach geladenen Spezies $[M+H+Na]^{2+}$ (100 %) und das schlechtere Fragmentierungsverhalten dieser Spezies erfordert eine höhere Mittelung der Spektren und längere Messzeiten. Eine Mittelung über mindestens 500 Spektren ist nötig um annehmbare Fragmentspektren zu erhalten, wohingegen bei den protonierten Spezies adäquate Spektren bereits mit 20 Mittelungen aufgenommen werden können.

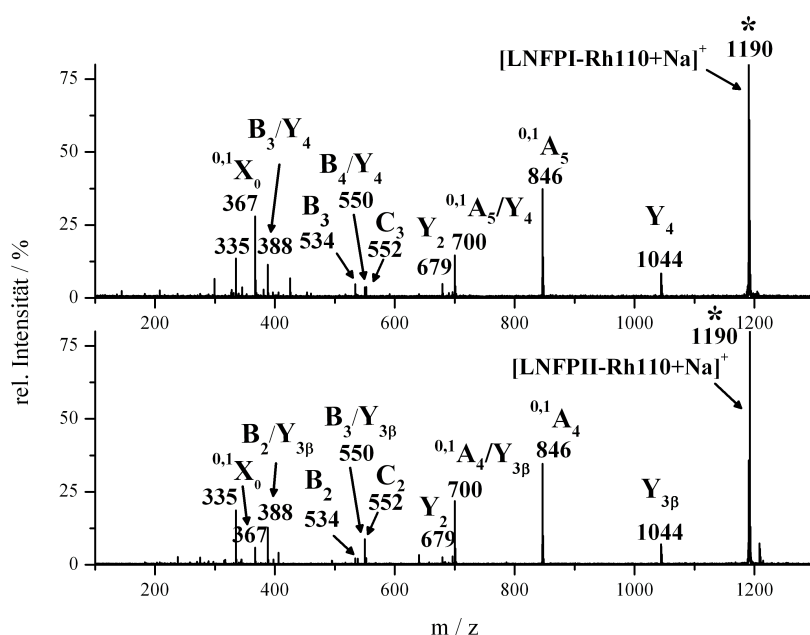


Abbildung 7.2: VisPD-Spektrum von (oben) $[LNFP\text{I-Rh110}+Na]^+$ und (unten) $[LNFP\text{II-Rh110}+Na]^+$ (beide m/z 1190,4).

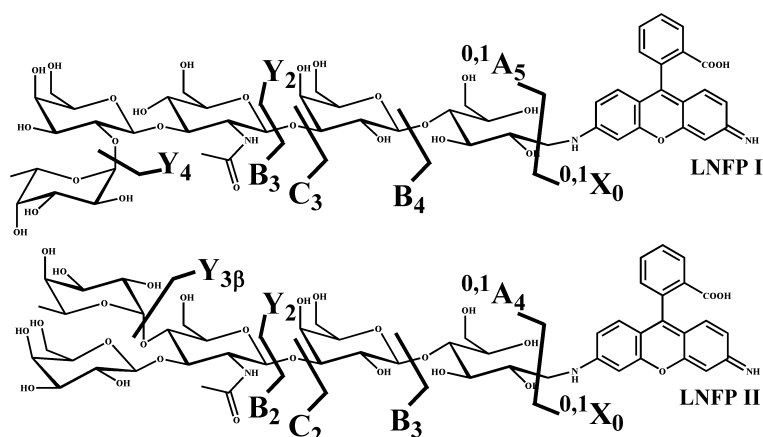


Abbildung 7.3: Fragmente von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+Na}]^+$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+Na}]^+$ bei der CID und VisPD.

In den VisPD-Spektren der Na-Adduktionen sind ausschließlich einfache Bindungsbrüche zu beobachten (Abb. 7.2 und Abb. 7.3). Bei den Bindungsbrüchen $^{0,1}\text{A}_5$ (LNFPI), $^{0,1}\text{A}_4$ (LNFPII) (beide m/z 846,3) und $^{0,1}\text{X}_0$ (m/z 367,1) handelt es sich nur formal um zweifache Ringbindungsbrüche. Die Position 0 wird bereits bei der Derivatisierung geöffnet. Die Fragmentierung erfolgt von beiden Seiten des Saccharids und auch innere Fragmente werden gebildet. Bei den Fragmenten die das Rh110-Label noch besitzen handelt es sich um die Ionen Y_4 ($\text{Y}_{3\beta}$ für LNFPII) (m/z 1044,4), Y_2 (m/z 679,2) und $^{0,1}\text{X}_0$ (m/z 367,1). Alle anderen Fragmente werden unter gleichzeitigem Verlust des Labels gebildet. Dazu gehören die Fragmente $^{0,1}\text{A}_5$ (LNFPII: $^{0,1}\text{A}_4$) (m/z 846,3), C_3 (LNFPII: C_2) (m/z 552,3) und B_3 (LNFPII: B_2) (m/z 534,3) sowie die inneren Fragmente $^{0,1}\text{A}_5/\text{Y}_4$ (LNFPII: $^{0,1}\text{A}_4/\text{Y}_{3\beta}$) (m/z 700,2), B_4/Y_4 (LNFPII: $\text{B}_3/\text{Y}_{3\beta}$) (m/z 550,3) und B_2/Y_4 (LNFPII: $\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta}$) (m/z 388,1). Bei dem Fragmentensignal m/z 388,1 ist zu beachten, dass die Zuordnung nicht eindeutig ist, da dieses Signal auch auf das isomere Fragment B_4/Y_3 (LNFPII: $\text{B}_3/\text{Y}_{3\alpha/3\beta}$) zurückgeführt werden kann. Anders, als bei der protonierten Spezies, sind keine Farbstofffragmente ohne Saccharidanteil zu erkennen. Die MS/MS-Spektren der Isomere LNFPI und II zeigen isomerenspezifischen Fragmente.

In den CID-Spektren, welche ein schlechtes Fragmentierungsverhalten aufweisen, können nur wenige Fragmente eindeutig zugeordnet werden. Es sind ebenfalls keine isomerenspezifische Signale zu erkennen (siehe Anhang Abb. B.12).

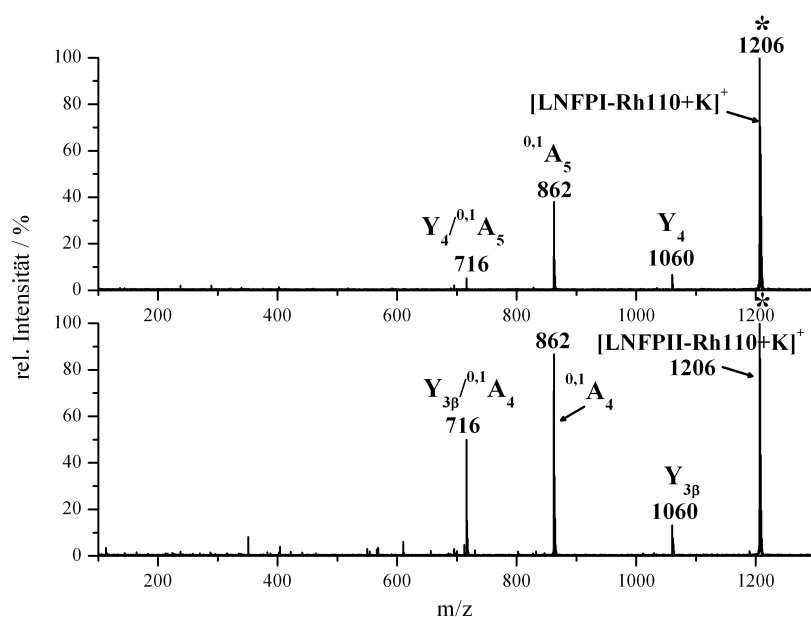


Abbildung 7.4: VisPD-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+K}]^+$, (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+K}]^+$ (beide m/z 1206,3).

$[\text{M+K}]^+$

Die VisPD-Spektren von $[\text{LNFPI-Rh110+K}]^+$ und $[\text{LNFPII-Rh110+K}]^+$ weisen nur wenige Fragmente auf (Abb. 7.4 und Abb. 7.5). Lediglich die Fragmente Y_4 (LNFPI) bzw. $Y_{3\beta}$ (LNFPII) (m/z 1060,3), $^{0,1}A_5$ (LNFPI) bzw. $^{0,1}A_4$ (LNFPII) (m/z 862,3) sowie das innere Fragment $^{0,1}A_5/Y_4$ (LNFPI) bzw. $^{0,1}A_4/Y_{3\beta}$ (LNFPII:) (m/z 716,2) sind zu sehen.

In den CID-Spektren der beiden Isomere, die im Anhang abgebildet sind (Abb. B.13), können die gleichen Fragmente beobachtet werden. Die $^{0,1}A$ -Fragmente weisen jedoch geringere Intensitäten auf (unter 15 %). Bei beiden Anregungsmethoden werden wieder keine reinen Farbstofffragmente gebildet.

7.2.2 Zweifach geladene Adduktionen

$[\text{M+H+Li}]^{2+}$

Die VisPD-Spektren von $[\text{LNFPI-Rh110+H+Li}]^{2+}$ und $[\text{LNFPII-Rh110+H+Li}]^{2+}$ sind in Abb. 7.6 dargestellt. Sie weisen eine Vielzahl an Signalen auf, die von protonierten

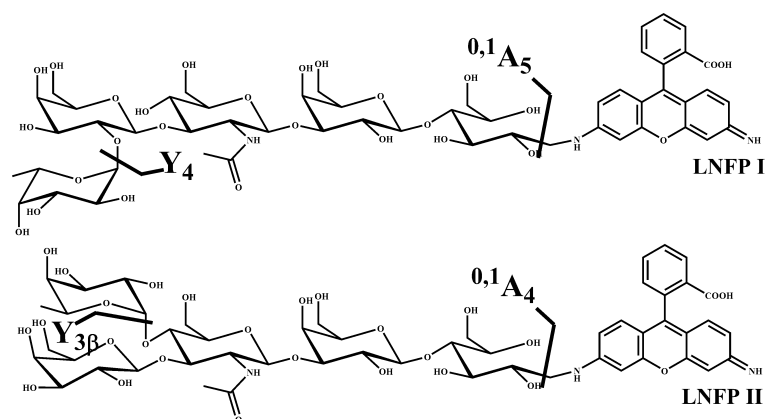


Abbildung 7.5: Fragmente von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110}+\text{K}]^+$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110}+\text{K}]^+$ bei der CID und VisPD.

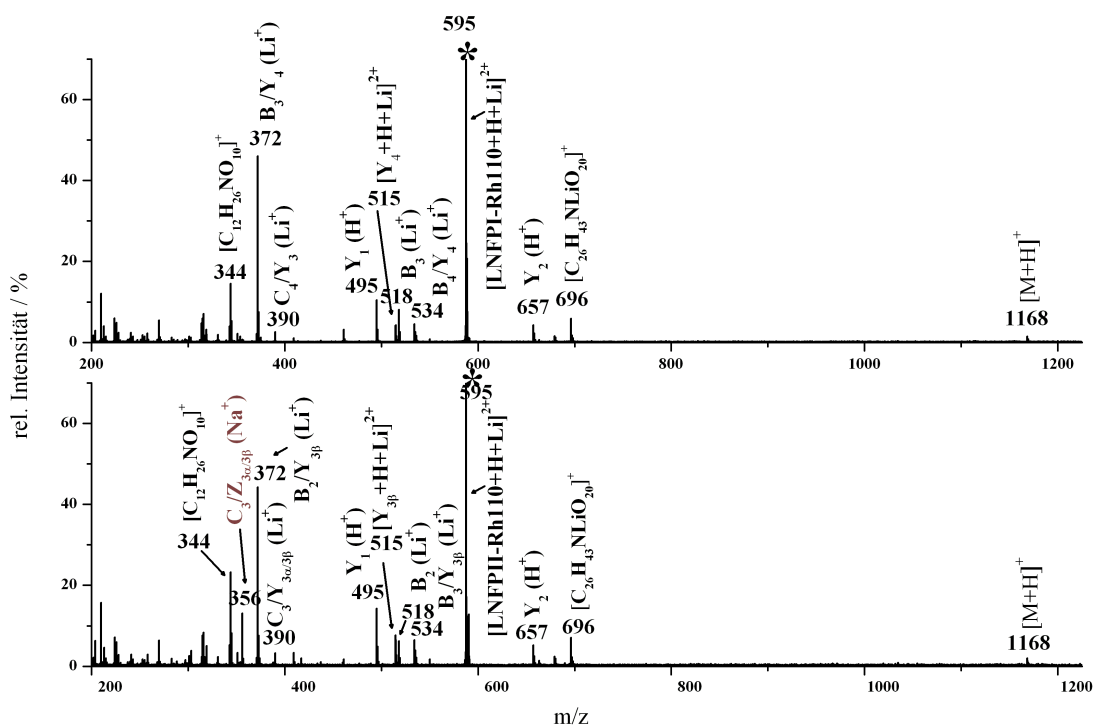


Abbildung 7.6: VisPD-Spektrum von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$ (beide m/z 587,7). Das isomerenspezifische Signal ist rot gelabelt.

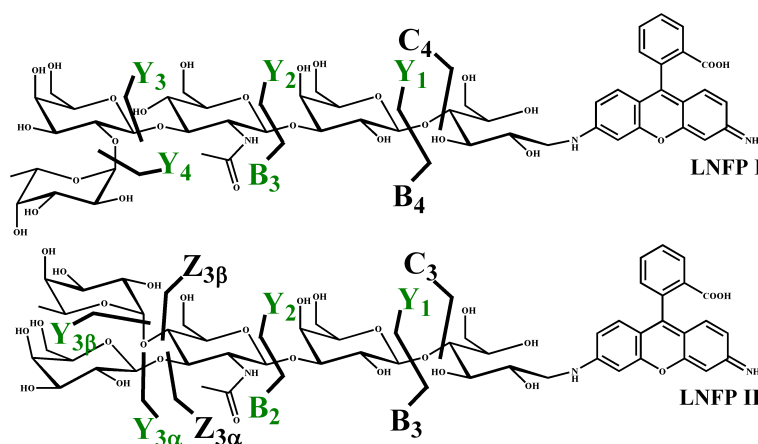


Abbildung 7.7: Fragmente von (oben) $[\text{LNFP I-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFP II-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$. Fragmente, die bei der CID und VisPD gebildet werden sind grün dargestellt. Bindungsbrüche, die nur bei der VisPD auftreten, sind schwarz eingezeichnet.

Ionen, Li-Adduktionen oder zweifach geladenen Ionen stammen. Bei höheren m/z -Verhältnissen ist nur die protonierte Spezies $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 1168,4) zu erkennen, die Spezies $[\text{M}+\text{Li}]^+$ kann nicht beobachtet werden. Alle Signale mit entsprechender Zuordnung sind in Tab. B.5 aufgelistet und graphisch in Abb. 7.7 dargestellt.

Es wurden ausschließlich glycosidische Bindungsbrüche beobachtet. Als protonierte Fragmente sind die Ionen Y_1 (m/z 495,2) und Y_2 (m/z 657,2) zu erkennen. Die Fragmentierung erfolgt hier, ähnlich wie bei den einfach protonierten Spezies (Abb. 5.11), von dem nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids.

Alle gebildeten Li-Adduktionen weisen den Verlust des Labels auf. Neben einer dominanten B-Typ-Fragmentierung ist eine gleichzeitige Y-Typ-Fragmentierung zu bemerken. Dies führt zu inneren Fragmentionen, wie z.B. dem $\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta}$ -Ion (m/z 534,2). Alle Li-Adduktionen beinhalten das GlcNAc. Auch innere Ionen des Typs C/Y und C/Z sind zu erkennen. Y- und Z-Typ-Fragmentierungen finden allgemein nicht ohne B- oder C-Typ-Fragmentierung statt. Z-Typ-Fragmentierung tritt dabei ausschließlich bei dem LNFP II-Derivat auf und führt zu einem $\text{C}_3/\text{Z}_{3\alpha/3\beta}$ -Ion bei m/z 356,1. Dieses Signal ist isomerenspezifisch. Die zweifach geladenen Signale bei m/z 514,7 können den Fragmenten $[\text{Y}_4+\text{Li}+\text{H}]^{2+}$ (LNFP I) und $[\text{Y}_{3\beta}+\text{Li}+\text{H}]^{2+}$ (LNFP II) zugeordnet werden.

Die CID-Spektren von $[\text{LNFP I-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$ und $[\text{LNFP II-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$ (Abb. 7.8) weisen deutliche Unterschiede zu den jeweiligen VisPD-Spektren auf. Es sind nicht nur Intensitätsunterschiede, sondern auch unterschiedliche Fragmente zu erkennen. Die CID-Spektren weisen zwischen m/z 370 und m/z 670 Signale auf. Es werden sowohl

protonierte

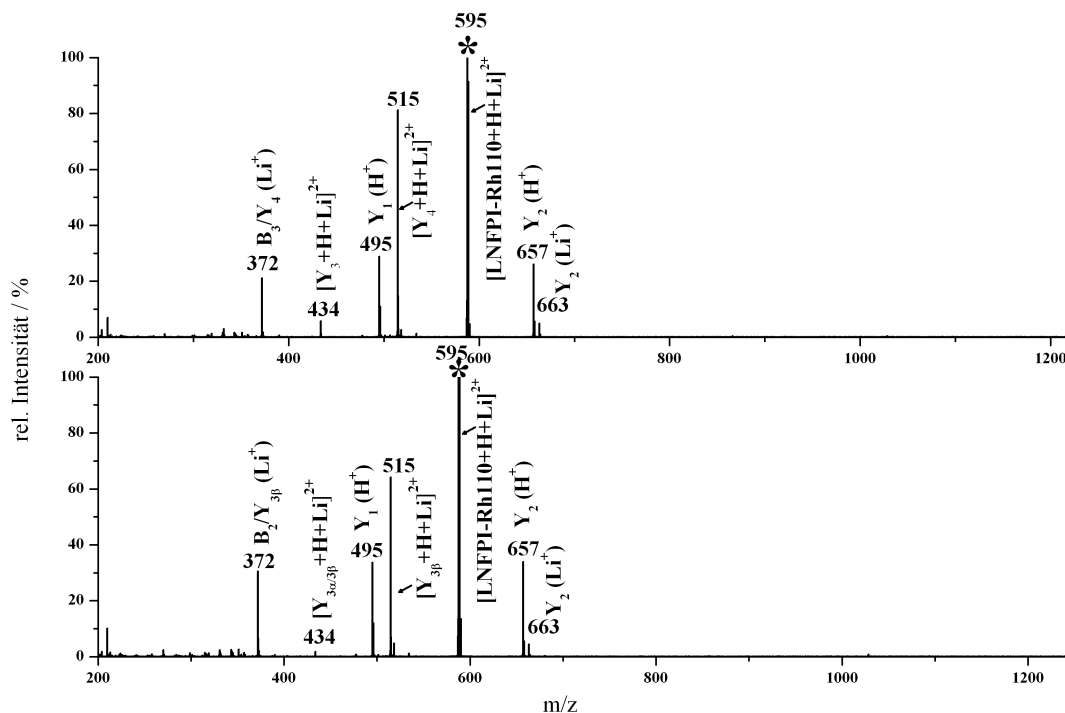


Abbildung 7.8: CID-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+Li}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+Li}]^{2+}$ (beide m/z 587,7).

Fragmente, Li-Adduktionen als auch zweifach geladene Fragmente gebildet. Die protonierte Spezies $[\text{M+H}]^+$ wird in den CID-Spektren nicht beobachtet, ebensowenig bilden sich die Li-Adduktionen $[\text{M+Li}]^+$.

Die Signalintensitäten der protonierten Fragmente sind von der Anregungsmethode abhängig. In den CID-Spektren besitzen die Y₁- (m/z 495,2) und Y₂-Ionen (m/z 657,2) deutlich höhere Signalintensitäten (30 %-40 %) als in den VisPD-Spektren (unter 20 %). Diese beiden Y-Ionen besitzen in den CID-Spektren ähnliche Intensitäten. In den VisPD-Spektren liegen die Intensitäten der Y₁-Ionen unter 15 %, und die der Y₂-Ionen sogar unter 5 %. Die Spektren unterscheiden sich bei den beiden verschiedenen Anregungsmethoden auch qualitativ. Einige Li⁺-Fragmente, die bei der VisPD entstehen, bilden sich nicht bei der CID (Abb. 7.7 und Tab. B.5). Auch das isomerenspezifische Fragment C₃/Z_{3α/3β} (LNFPII) bei m/z 356,1 ist in den CID-Spektren nicht zu erkennen. Die Isomere können somit mittels VisPD, aber nicht mittels CID unterschieden

werden.

Bei der CID werden auch Fragmente gebildet, die bei der VisPD nicht entstehen. Dabei handelt es sich um die Li-Adduktionen $[Y_2+Li]^+$, welche mit geringer Intensität (unter 10 %) bei m/z 663,2 gebildet werden und die zweifach geladenen Signale bei m/z 433,6, die den Fragmenten $[Y_3+H+Li]^{2+}$ (LNFPI) und $[Y_{3\alpha/3\beta}+Li+H]^{2+}$ (LNFPII) zugeordnet werden können. Die zweifach geladenen Fragmentationen $[Y_4+H+Li]^{2+}$ (LNFPI) und $[Y_{3\beta}+H+Li]^{2+}$ (LNFPII) besitzen in den CID-Spektren deutlich höhere Signalintensitäten (über 60 %) als in den VisPD-Spektren der vergleichbaren Isomere (unter 10 %).

$[M+H+Na]^{2+}$

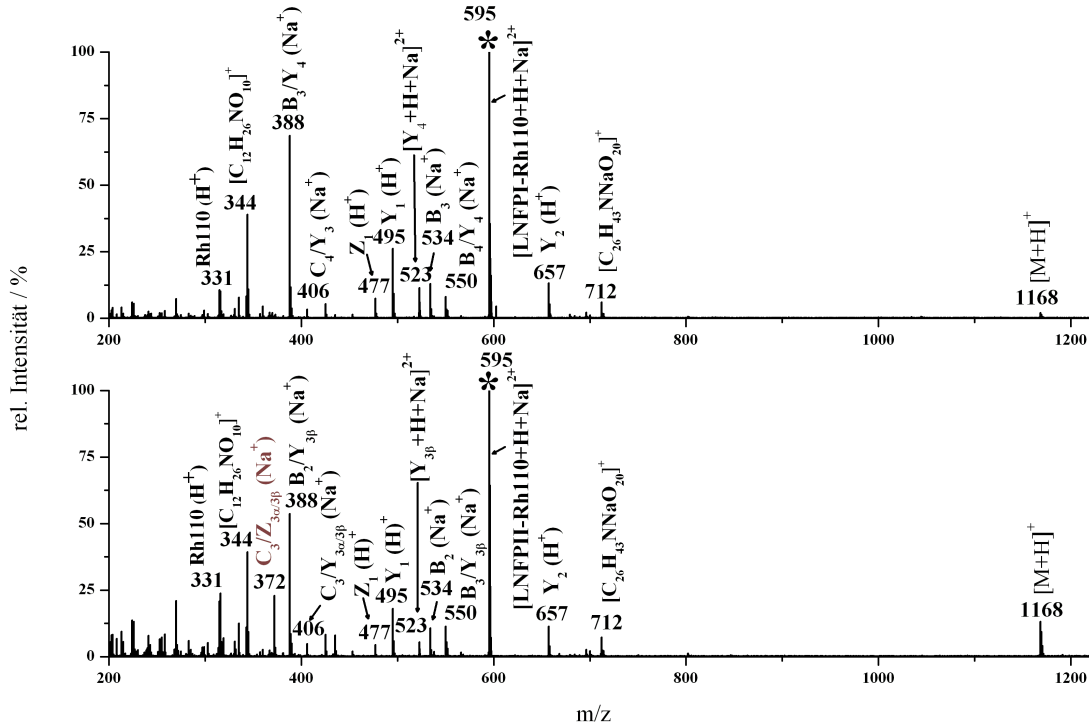


Abbildung 7.9: VisPD-Spektren von (oben) $[LNFPI-Rh110+H+Na]^{2+}$ und (unten) $[LNFPII-Rh110+H+Na]^{2+}$ (beide m/z 595,7). Das isomerenspezifische Signal ist rot gelabelt.

In den VisPD-Spektren von $[LNFPI-Rh110+H+Na]^{2+}$ und $[LNFPII-Rh110+H+Na]^{2+}$ sind zahlreiche Signale zu erkennen (Abb. 7.9). Eine genaue Übersicht der Fragmente

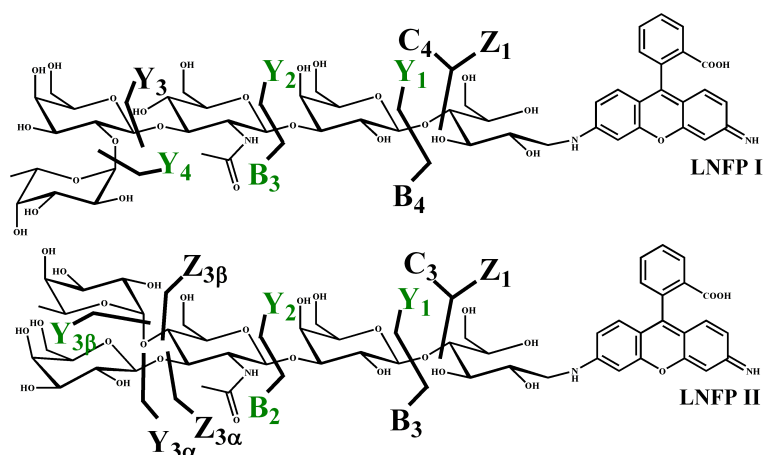


Abbildung 7.10: Fragmente von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+Na}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+Na}]^{2+}$. Fragmente, die bei der CID und VisPD gebildet werden, sind grün dargestellt. Bindungsbrüche, die nur bei der VisPD auftreten, sind schwarz eingezeichnet.

befindet sich in Tab. B.6 und eine graphische Darstellung in Abb. 7.10. Bei den verschiedenen Signalen handelt es sich um protonierte Fragmente, Na-Adduktionen oder zweifach geladene Fragmente. Sie werden ausschließlich durch glycosidische Bindungsbrüche gebildet.

Als protonierte Fragmente werden die Oligosaccharide $[\text{M+H}]^+$ (m/z 1168,4) sowie die Fragmente Z_1 (m/z 477,2), Y_1 (m/z 495,2) und Y_2 (m/z 657,2) beobachtet. Die Fragmentierung erfolgt hierbei wieder von der nicht-reduzierenden Seite des Oligosaccharids.

Bei allen Na-Adduktfragmenten ist der Verlust des Labels zu bemerken. Es werden C-Typ-Ionen gebildet, aber die Bildung von B-Typ-Ionen findet bevorzugt statt. Des Weiteren sind innere Fragmente des Typs B/Y, C/Y und C/Z zu erkennen. Y-Typ-Fragmentierung findet hierbei nie ohne B- oder C-Typ-Fragmentierung statt. Ein ähnliches Fragmentierungsverhalten wurde bereits bei der VisPD der Spezies $[\text{M+H+Li}]^{2+}$ beobachtet (Abb. 7.6). Alle Na-Adduktionen im Spektrum besitzen noch das GlcNAc. Eine Unterscheidung der Isomere ist anhand von inneren Fragmenten möglich. Hierbei handelt es sich um das $\text{C}_3/\text{Z}_{3\alpha/3\beta}$ -Fragment (m/z 371,1), welches ausschließlich bei LNFPII auftritt.

Bei m/z 522,7 werden zweifach geladene Signale beobachtet, bei denen es sich um die Fragmente $[\text{Y}_4+\text{H+Na}]^{2+}$ (LNFPI) bzw. $[\text{Y}_{3\beta}+\text{H+Na}]^{2+}$ (LNFPII) handelt.

In den CID-Spektren (Abb. 7.11) sind weniger Signale zu sehen als in den VisPD-Spektren. In dem Massenbereich zwischen m/z 380 und m/z 680 treten einfach geladene protonierte Fragmente, Na-Adduktionen und zweifach geladene Fragmente auf. Eine

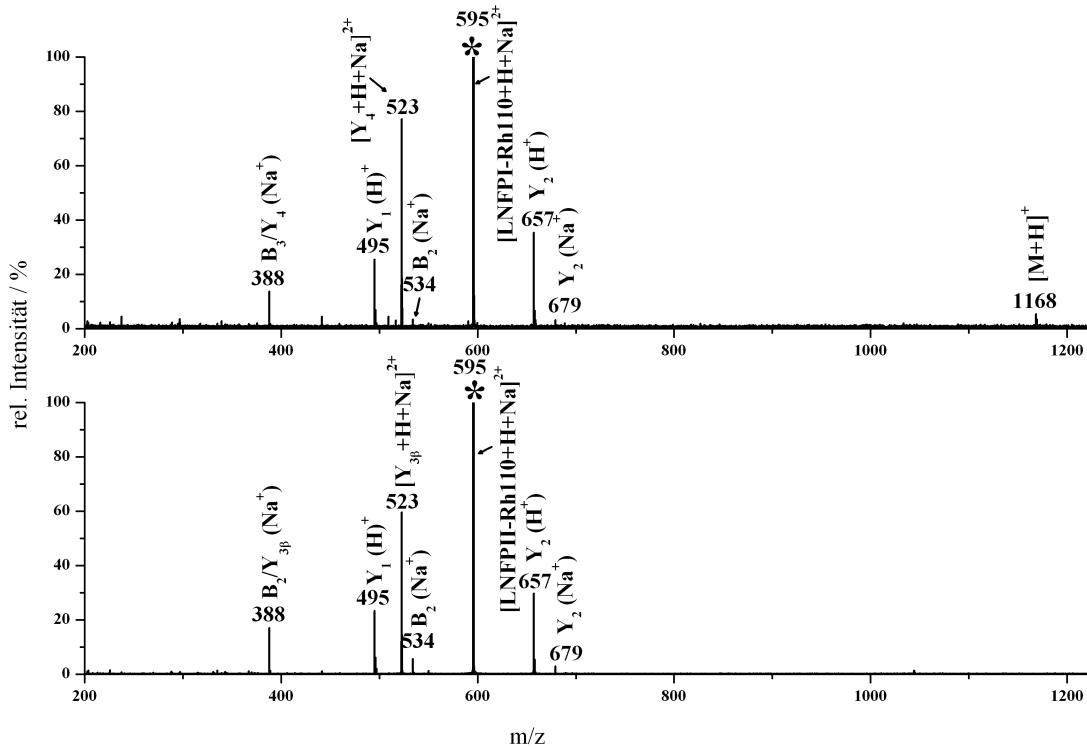


Abbildung 7.11: CID-Spektren von (oben) $[\text{LNFP I-Rh110+H+Na}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFP II-Rh110+H+Na}]^{2+}$ (beide m/z 595,7).

genaue Übersicht dieser Fragmente befindet sich in Tab. B.6 und ist graphisch in Abb. 7.10 dargestellt.

Die protonierten Fragmente Y_1 (m/z 495,2) und Y_2 (m/z 657,2) werden bei der CID mit höheren Intensitäten gebildet als bei der VisPD. Bei der CID besitzen beide Fragmentionen ähnliche Intensitäten, wohingegen bei der VisPD die Intensitäten der Y_2 -Ionen deutlich geringer ausfallen (LNFP I: 7%) als die Intensitäten der Y_1 -Ionen (LNFP I: 27%).

Qualitative Unterschiede zwischen den Anregungsmethoden sind ebenfalls zu erkennen. Bei der VisPD entstehen deutlich mehr und intensivere Na-Adduktionen als bei der CID. Auch das isomerenspezifische Fragment $C_3/Z_{3\alpha/3\beta}$, welches bei der VisPD entsteht, ist in den CID-Spektren von LNFP II nicht zu erkennen. Die Isomere weisen somit bei der CID keine isomerenspezifischen Fragmente auf. Die zweifach geladenen Fragmente $[Y_4+H+Na]^{2+}$ (LNFP I) $[Y_{3\beta}+H+Na]^{2+}$ (LNFP II) bei m/z 522,6 sind in den

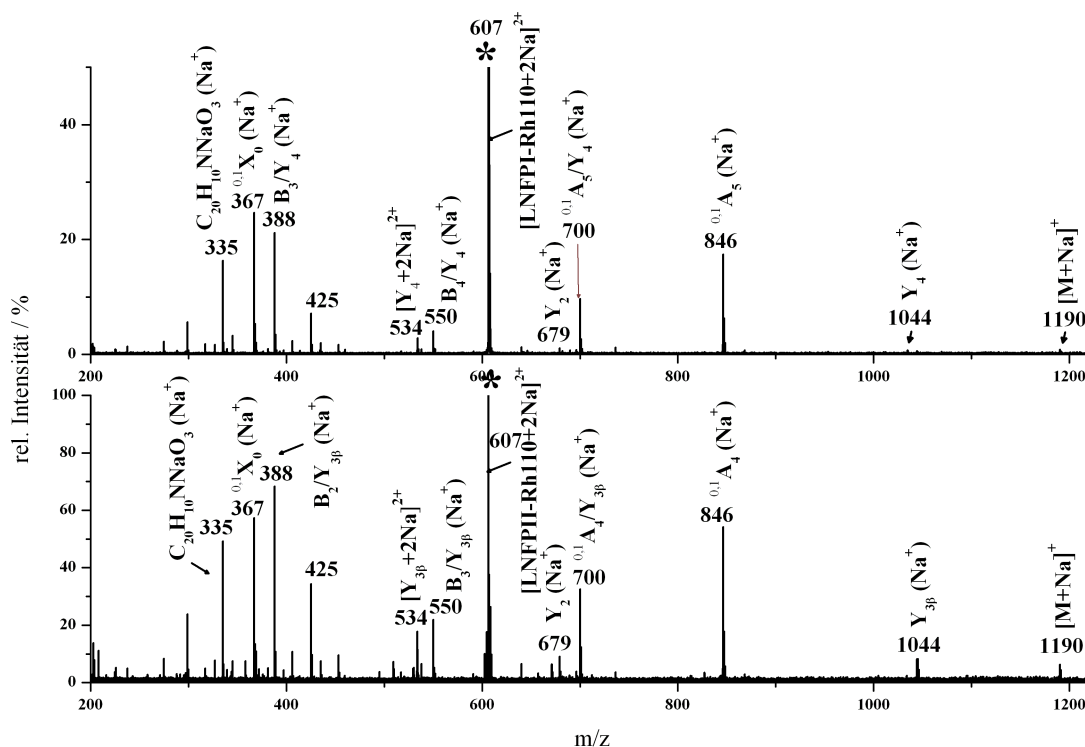


Abbildung 7.12: VisPD-Spektren von (oben) [LNFPI-Rh110+2Na]²⁺ und (unten) [LNFPII-Rh110+2Na]²⁺ (beide m/z 606,7).

CID-Spektren mit höherer Intensität vorhanden (über 60 %) als in den VisPD-Spektren. Die einfach geladenen Na-Adduktionen [Y₂+Na]⁺ (LNFP I) und [Y₂+Na]⁺ (LNFP II) (m/z 679,2) werden mit geringen Intensitäten von max. 17 % beobachtet.

Die MS/MS-Spektren von [M+H+Na]²⁺ ähneln den jeweiligen [M+H+Li]²⁺-Spezies. Dieses ähnliche Fragmentierungsverhalten ist sowohl bei der VisPD wie auch bei der CID zu beobachten.

[M+2Na]²⁺

Bei der VisPD der Spezies [LNFPI-Rh110+2Na]²⁺ und [LNFPII-Rh110+2Na]²⁺ (Abb. 7.12) finden ähnliche Bindungsbrüche wie bei dem einfach geladenen Na-Adduktionen [M+Na]⁺ statt (Abb. 7.2).

Eine Auflistung aller Fragmente der PD- und CID-Spektren mit zugehörigen Massen

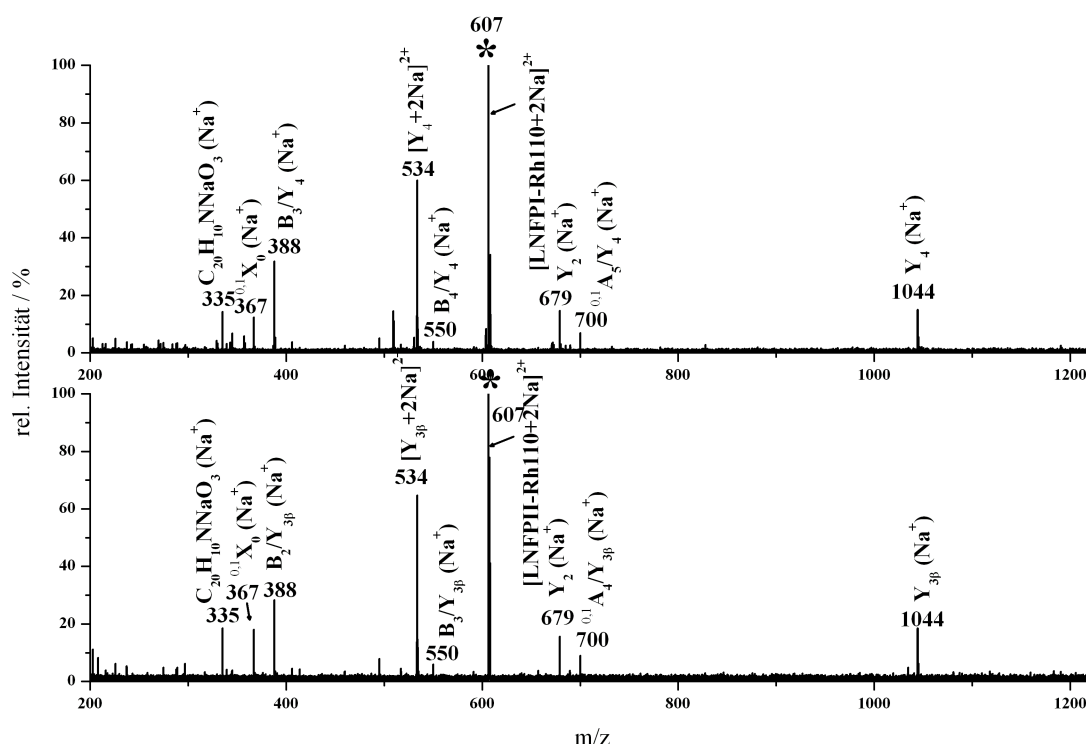


Abbildung 7.13: CID-Spektren von (oben) $[LNFP\text{I-Rh110}+2Na]^{2+}$ und (unten) $[LNFP\text{II-Rh110}+2Na]^{2+}$ (beide m/z 606,7). Die isomerenspezifischen Signale sind rot gelabelt.

befindet sich in Tab. B.7. Eine graphische Darstellung der Fragmente ist in Abb. 7.12 zu sehen. Die Fragmente werden auch hier durch einfache Bindungsbrüche gebildet. Die Ringbruchfragmente $^{0,1}A_5$ (LNFP II: $^{0,1}A_4$) bei m/z 846,3 und $^{0,1}X_0$ (m/z 367,1) werden durch den Bruch einer Bindung im Ring gebildet. Die Fragmentierung der Oligosaccharide erfolgt von beiden Seiten der Saccharide und auch innere Fragmente sind in dem Spektrum zu beobachten.

Die Fragmente, die das Label besitzen, sind die Y_4 - (LNFP I) bzw. $Y_{3\beta}$ -Ionen (LNFP II) (m/z 1044,4), die Y_2 -Ionen (m/z 679,2) und die $^{0,1}X_0$ -Ionen (m/z 367,1). Es sind keine isomerenspezifischen Fragmente zu erkennen.

Die weiteren Fragmente werden durch glycosidische Y-Typ-Bindungsbrüche in Kombination mit B- oder $^{0,1}A_5$ - (LNFP I) bzw. $^{0,1}A_4$ -Typ-Fragmentierung (LNFP II) gebildet. Die einfach geladenen Oligosaccharide $[M+Na]^+$ (m/z 1190,4) sind nur in geringer In-

tensität zu erkennen. Zweifach geladene Signale treten bei m/z 533,7 auf und können den Fragmenten $[Y_4+2Na]^{2+}$ (LNFP I) und $[Y_{3\beta}+2Na]^{2+}$ (LNFP II) zugeordnet werden.

Die CID-Spektren von $[LNFP\text{I-Rh110}+2Na]^{2+}$ und $[LNFP\text{II-Rh110}+2Na]^{2+}$, die in Abb. 7.13 dargestellt sind, ähneln qualitativ den VisPD-Spektren. Zwischen den beiden Anregungsmethoden ist jedoch ein deutlicher Unterschied in den Signalintensitäten einiger Fragmente zu erkennen. Die zweifach geladenen Fragmente $[Y_4+2Na]^{2+}$ (LNFP I) und $[Y_{3\beta}+2Na]^{2+}$ (LNFP II) besitzen in den CID-Spektren deutlich größere Signalintensitäten (über 60 %) als in den VisPD-Spektren (unter 20 %). Auch anhand der CID-Spektren können die Isomere LNFP I und LNFP II nicht unterschieden werden.

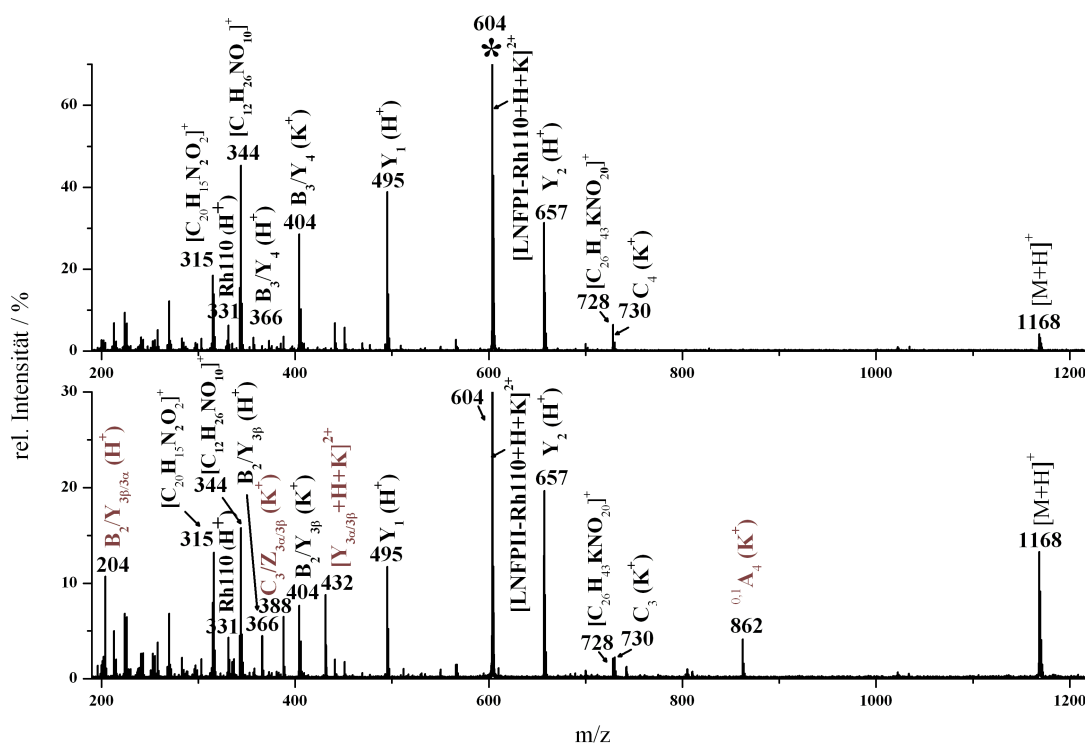


Abbildung 7.14: VisPD-Spektren von (oben) $[LNFP\text{I-Rh110}+H+K]^{2+}$ und (unten) $[LNFP\text{II-Rh110}+H+K]^{2+}$ (beide m/z 603,7) .

$[M+H+K]^{2+}$

Anders als die Ionenspezies $[M+H+Li]^{2+}$ und $[M+H+Na]^{2+}$ der derivatisierten Oligosaccharide, die sich in ihrem Fragmentierungsverhalten ähneln, besitzen die Spezies

$[\text{LNFP I-Rh110}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ und $[\text{LNFP II-Rh110}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ einzigartige Fragmentierungsmuster (Abb. 7.14). In Tab. B.9 befindet sich eine Auflistung der beobachteten Fragmente, die bei der VisPD und CID auftreten, mit zugehörigen Massen und der Fragmentzuordnung. Die Bindungsbrüche sind schematisch in Abb. 7.15 dargestellt.

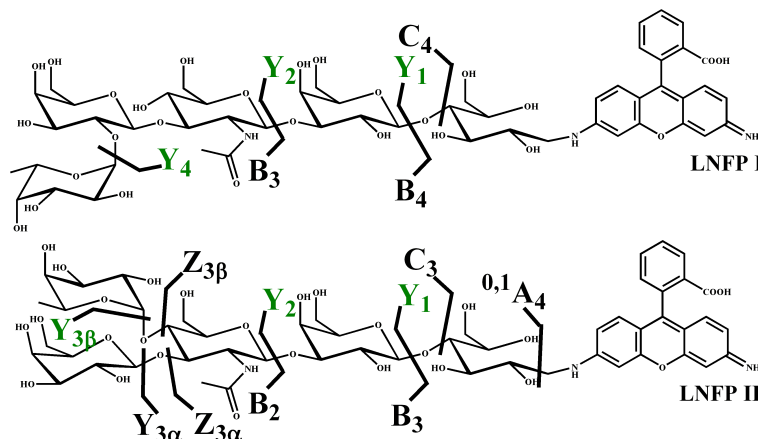


Abbildung 7.15: Fragmente von (oben) $[\text{LNFP I-Rh110}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFP II-Rh110}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$. Fragmente, die bei der CID und VisPD gebildet werden, sind grün dargestellt. Bindungsbrüche, die nur bei der VisPD auftreten, sind schwarz eingezeichnet.

Bei der VisPD werden protonierte Fragmente, K-Adduktionen und zweifach geladene Fragmentationen im Spektrum beobachtet. Die protonierten Ionen Y_1 und Y_2 werden gebildet, wobei die Fragmentierung von der nicht-reduzierenden Seite des Saccharids erfolgt.

Die K-Adduktfragmente weisen den Verlust des Labels auf. Es werden überwiegend die inneren B/Y-Typ-Ionen gebildet. Aber auch ein C/Z-Typ-Fragment bei m/z 388,1 und ein C_3 -Ion bei m/z 730 sind im Spektrum zu beobachten.

Bis auf das $^{0,1}A_4$ -Fragment (K^+) bei m/z 862,3, welches ausschließlich bei dem LNFP II-Derivat beobachtet wird, werden alle Fragmente durch glycosidische Bindungsbrüche gebildet. Neben diesem Fragment ist zusätzlich das K-Adduktfragment $C_3/Z_{3\alpha/3\beta}$ (m/z 388,1) isomerenspezifisch, das nur im Spektrum des LNFP II-Derivates zu beobachten ist. Weitere isomerenspezifische Signale sind das protonierte Fragment $B_2/Y_{3\alpha/3\beta}$ bei m/z 204,1 und das zweifach geladene Fragment $[Y_{3\alpha/3\beta}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ (m/z 431,6), welche nur bei den LNFP II-Derivaten auftreten. Bei der CID der derivatisierten Oligosaccharide werden nur wenige, ausschließlich protonierte Y-Ionen gebildet. Diese sind das Y_1 - (m/z 495,2), Y_2 - (m/z 675,2) und mit geringer Intensität das Y_4 -Ion (m/z 1022,3) bei dem LNFP I-Derivat und die Fragmente Y_1 und Y_2 bei dem LNFP II-Derivat. Bei der CID

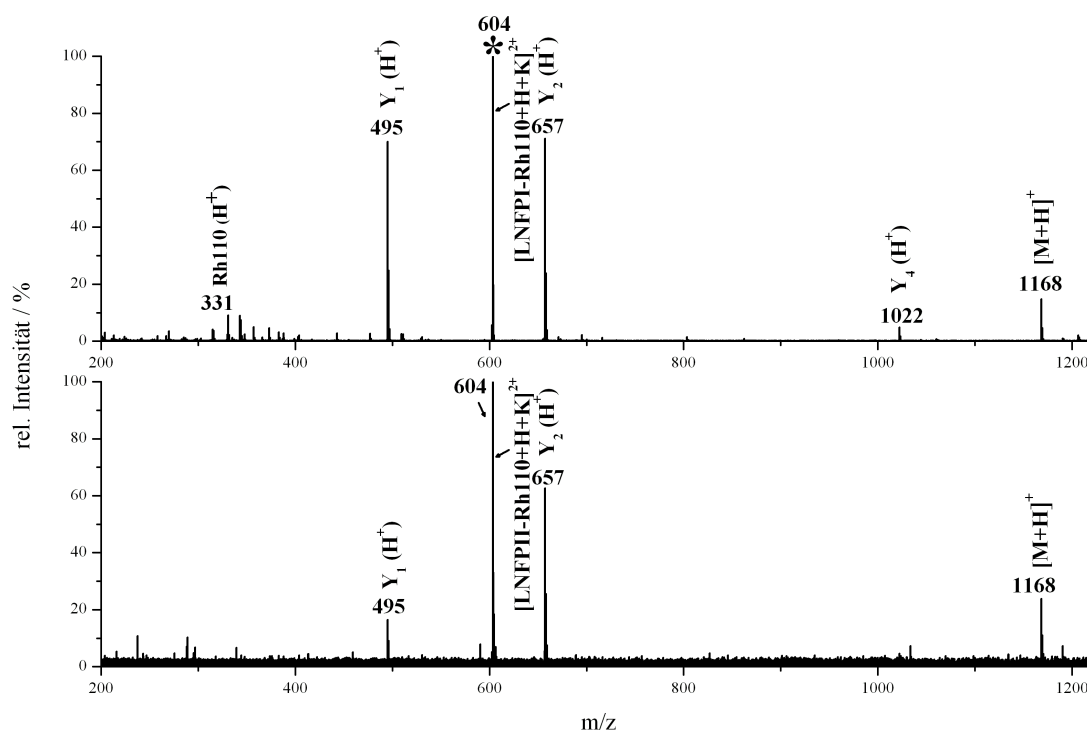


Abbildung 7.16: CID-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+K}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+K}]^{2+}$ (beide m/z 603,7).

von $[\text{M+H+K}]^{2+}$ werden, anders als bei den vergleichbaren Li- und Na-Adduktionen, weder Alkali-Adduktfragmente noch zweifach geladene Ionen gebildet. Es sind keine isomerspezifischen Signale im Spektrum vorhanden.

7.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Fragmentmuster bei der VisPD

Im Allgemeinen entstehen bei der VisPD der Adduktionen von LNFPI-Rh110 und LNFPII-Rh110 sehr signalreiche Fragmentspektren, die strukturelle Informationen bieten. Anders als bei der Fragmentierung der protonierten Spezies findet die Fragmentierung von beiden Seiten des Saccharids statt. Neben Y- und Z-Typ-Fragmenten sind auch B- und C-Typ-Fragmente zu erkennen. Ein weiterer Unterschied zur protonierten Spezies ist das Fehlen von intensiven Farbstofffragmenten ohne Saccharidanteil. Weder

bei den einfach geladenen Alkali-Addukten noch bei den Spezies $[M+H+Me]^{2+}$ (Me = Li, Na oder K) findet eine Umlagerung der Fucose statt, welche bei den protonierten Spezies auftritt. Dies kann darin begründet liegen, dass die Fucose an das Metallion komplexiert oder das Metallion die Struktur soweit ändert, dass eine Umlagerung nicht möglich ist.

Wie bei den Spezies $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ werden auch bei $[M+2Na]^+$ einfach geladene Alkali-Adduktfragmente in den Spektren beobachtet. Zusätzlich treten bei $[M+2Na]^+$ aber auch zweifach geladene Fragmente auf. Bei den Spezies $[M+H+Li]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ und $[M+H+K]^{2+}$ werden protonierte Fragmente, Adduktionen und auch zweifach geladene Fragmente gebildet. Die verschiedenen Ionenspezies fragmentieren an unterschiedlichen Bindungen und sich ergänzende Strukturinformationen können gewonnen werden. Die protonierten Fragmente gehen überwiegend auf Bindungsbrüche, ausgehend von dem nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids, zurück. Dabei werden Y_1 und Y_2 -Fragmente beobachtet, welche das intakte Label noch besitzen. Diese Art der Fragmentierung ist ein Anzeichen dafür, dass die Protonierung bevorzugt am Label stattfindet, wie dies auch bei den einfach protonierten Molekülen der Fall ist. Bei Betrachtung der einfach geladenen Alkali-Adduktfragmente sind je nach Vorläuferion unterschiedliche Tendenzen zu erkennen. Bei den einfach geladenen Spezies $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ findet die Fragmentierung von beiden Seiten des Oligosaccharids statt. Es werden von der reduzierenden Seite B-, C- oder $^{0,1}A_5$ - (LNFP I) bzw. $^{0,1}A_4$ -Typ-Ionen (LNFP II) gebildet. Von der nicht-reduzierenden Seite resultieren Y- oder $^{0,1}X_0$ -Typ-Ionen. Ebenso werden innere Ionen gebildet, meist B/Y-Typ. Ein ähnliches Fragmentierungsmuster wird auch bei der zweifach geladenen Spezies $[M+2Na]^{2+}$ beobachtet. Bei den Spezies $[M+H+Li]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ und $[M+H+K]^{2+}$ findet die Fragmentierung überwiegend von der reduzierenden Seite des Saccharids statt, was zu B- und C-Typ-Ionen führt. Eine Y- oder Z-Typ-Fragmentierung geht fast immer mit einer B- oder C-Typ-Fragmentierung einher, dies führt zu inneren B/Y-, C/Y- und C/Z-Ionen. Alkali-Adduktfragmente besitzen, bis auf wenige Ausnahmen, nicht mehr das Label und in einigen Fällen nicht die Fucose, da diese bei Saccharidkationen eine gute Abgangsgruppe darstellt. Die Alkali-Fragmente beinhalten das GlcNAc, was für eine Komplexierung des Metallions in der Nähe dieses Monomers spricht.

Bei den zweifach geladenen Fragmenten, welche in den VisPD-Spektren der Spezies $[M+2Na]^{2+}$, $[M+H+Li]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ und $[M+H+K]^{2+}$ zu finden sind, handelt es sich ausschließlich um Y-Ionen. Die Fragmentierung findet somit von der nicht-reduzierenden Seite des jeweiligen Oligosaccharids statt.

Innerhalb der verschiedenen Ionenspezies sind verschiedene Tendenzen zu erkennen. Die Spezies $[M+H+Li]^{2+}$ und $[M+H+Na]^{2+}$ ähneln sich deutlich in ihrem Fragmentierungsverhalten. Die Ionen $[M+H+K]^{2+}$ unterscheiden sich in ihrem Fragmentierungsverhalten von diesen Spezies. Auch mit den Fragmentspektren von $[M+K]^+$ sind wenige Gemeinsamkeiten zu erkennen. Das einzige Fragment, welches bei beiden Spezies gebildet wird, ist das $^{0,1}A_4$ -Fragment (LNFP II). Dieser Bindungsbruch ist in den Fragmentspektren von $[LNFP\text{ I-Rh110}+K]^+$ (hier $^{0,1}A_5$) und $[LNFP\text{ II-Rh110}+K]^+$ zu beobachten, aber nicht bei der Spezies $[LNFP\text{ I-Rh110}+H+K]^{2+}$.

Anhand der VisPD-Spektren der Spezies $[M+H+Li]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ und $[M+H+K]^{2+}$ können die Isomere LNFP I und LNFP II unterschieden werden. Bei den Spezies $[LNFP\text{ II}+H+Li]^{2+}$ und $[LNFP\text{ II}+H+Na]^{2+}$ ist das isomerenspezifische Fragment $C_3/Z_{3\alpha/3\beta}$ bei LNFP II zu erkennen. Bei der Ionenspezies $[LNFP\text{ II}+H+K]^{2+}$ sind zusätzlich noch drei weitere isomerenspezifische Fragmente zu beobachten.

Vergleich VisPD und CID

In den MS/MS-Spektren der Spezies $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ sind nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Anregungsmethoden CID und VisPD zu bemerken.

Bei den zweifach geladenen Ionen $[M+H+Me]^{2+}$ ($Me = Li, Na$ oder K) und $[M+2Na]^{2+}$ weisen die CID-Spektren jedoch deutliche Unterschiede zu den jeweiligen VisPD-Spektren auf. Dabei handelt es sich sowohl um Intensitätsunterschiede der Signale als auch um unterschiedliche Fragmente. Im Allgemeinen sind in den VisPD-Spektren mehr Signale zu finden als in den CID-Spektren der gleichen Ionenspezies. Die CID-Spektren von $[M+H+Li]^{2+}$ und $[M+H+Na]^{2+}$ weisen ähnliche Fragmentensignale auf, dies deutet wieder auf ähnliche Fragmentierungswege hin. In beiden Spektren sind Alkali-Adduktionen und protonierte Ionen zu sehen.

Bei den protonierten Fragmenten in den CID-Spektren von $[M+H+Me]^{2+}$ ($Me = Li, Na$ oder K), bei denen es sich fast ausnahmslos um Y-Ionen handelt, ist eine Zunahme der Signalintensitäten im Vergleich zu den VisPD-Spektren zu beobachten. In allen CID-Spektren werden jedoch weniger Adduktionensignale beobachtet als in den vergleichbaren VisPD-Spektren. In den Spektren der Spezies $[M+H+K]^{2+}$ fehlen diese Adduktfragmente vollständig und bis auf das Vorläuferion sind ausschließlich protonierte Ionen zu beobachten.

Neben den protonierten Fragmenten werden bei der CID auch die zweiwertigen Fragmente mit deutlich höheren Intensitäten gebildet als bei der VisPD. Bei den Fragmenten handelt es sich um die Ionen $[Y_4+2Na]^{2+}$ (LNFP I) und $[Y_{3\beta}+2Na]^{2+}$ (LNFP II) oder

$[Y_4+H+Me]^{2+}$ (LNFP I) und $[Y_{3\beta}+H+Me]^{2+}$ (LNFP II). In den CID-Spektren sind diese Fragmente mit Signalintensitäten über 60 % zu erkennen, wohingegen sie in den VisPD-Spektren meistens unter 20 % liegen.

Im Allgemeinen besitzen die VisPD-Spektren mehr strukturspezifische Fragmente als die vergleichbaren CID-Spektren. Besonders die Adduktionen-Fragmente, die bei der CID seltener auftreten, besitzen einen hohen Informationsgehalt im Bezug auf die Unterscheidung der Isomere. Anhand der CID-Spektren kann, aufgrund des Fehlens der entscheidenden Fragmentensignale, keine Unterscheidung der Isomere stattfinden.

8

Kapitel 8

VisPD der deprotonierten Oligosaccharide

Das Fragmentierungsmuster deprotonierter Oligosaccharide, also negativ geladener Ionen, unterscheidet sich deutlich von dem der protonierten Ionen oder der Adduktionen. Im Folgenden werden die VisPD und die CID von gelabelten und ungelabelten, deprotonierten Oligosacchariden beschrieben.

Anhand der Analyte $[\text{MP-Rh110-H}]^-$, $[\text{MP-2AT-H}]^-$, $[\text{LNFPI-Rh110-H}]^-$ und $[\text{LNFPII-Rh110-H}]^-$ werden die Unterschiede bei der VisPD und der CID gezeigt. Diese Spektren wurden mit den CID-Spektren der unterivatisierten, deprotonierten Oligosaccharide verglichen.

8.1 Maltopentaose

CID von $[\text{Maltopentaose-H}]^-$

Das CID-Spektrum der deprotonierten Maltopentaose ($[\text{MP-H}]^-$) ist in Abb. 8.1 dargestellt. Das Molekül verliert von der reduzierenden Seite des Oligosaccharids Monomere, was zu der vollständigen C-Typ-Fragmentserie führt (Abb. 8.2). Die Zuordnung der Fragmente ist folgende: C_4 (m/z 665,2), C_3 (m/z 503,2), C_2 (m/z 341,1) und C_1 (m/z 179,1). Ein Verlust von Wasser wird bei dem C_1 -Fragment beobachtet und resultiert in einem intensiven B_1 -Fragment (m/z 161,1). Innere Fragmente, die durch gleichzeitige Y- und C-Typ-Fragmentierung gebildet werden, besitzen die gleichen Massen wie die C-Typ-Fragmente und können von diesen massenspektrometrisch nicht unterschieden werden. Die Fragmentierung von deprotonierten, unverzweigten Oligosacchariden erfolgt aber

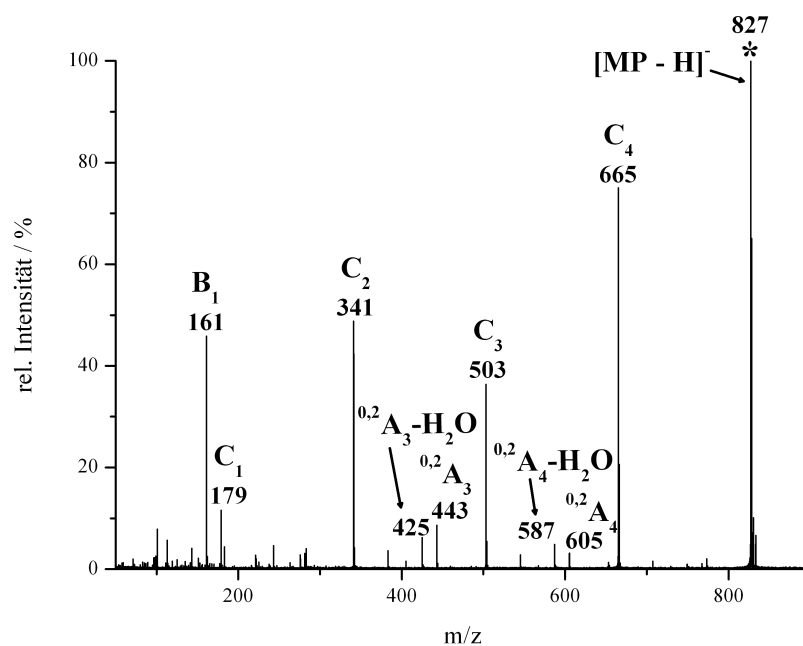


Abbildung 8.1: CID-Spektrum von [Maltopentaose-H]⁻ (m/z 827,3).

gewöhnlich von der reduzierenden Seite, so dass innere Fragmente ausgeschlossen werden können.[94, 95] Mit geringen Intensitäten (unter 12 %) treten im Spektrum auch die ^{0,2}A-Typ-Ringbrüche ^{0,2}A₄ (m/z 605,2) und ^{0,2}A₃ (m/z 443,2) auf. Ausgehend von diesen Fragmenten wird die Eliminierung von Wasser mit geringer Intensität (unter 10 %) beobachtet (m/z 587,2; m/z 425,2).

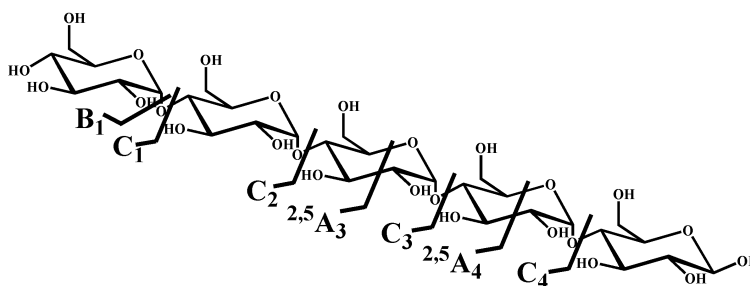


Abbildung 8.2: Fragmente von [MP-H]⁻ bei der CID.

VisPD und CID von [Maltopentaose-Rhodamin110 - H]⁻

Eine intensive Fragmentierung der deprotonierten Spezies [MP-Rh110 - H]⁻ (m/z 1141,4) erfolgt bei der VisPD schon bei geringer Laserintensität (0,2 W, 488 nm) (Abb. 8.3). In dem signalreichen Spektrum sind ausschließlich Fragmente ohne Label zu erkennen (Abb. 8.4). Wie in dem CID-Spektrum des underivatisierten Oligosaccharids treten die C-Typ-Ionen bei m/z 503,2 (C_3), m/z 341,1 (C_2) und m/z 179,1 (C_1) auf, begleitet von einem intensiven B_1 -Fragment bei m/z 161,1. Zusätzlich zu diesen glycosidischen Bindungsbrüchen sind Ringbrüche zu erkennen. Dazu gehören die $^{2,4}A$ -Typ-Ringbrüche $^{2,4}A_5$ (m/z 707,2), $^{2,4}A_4$ (m/z 545,2), $^{2,4}A_3$ (m/z 383,1), $^{2,4}A_2$ (m/z 281,1) und die $^{0,2}A$ -Typ-Ringbrüche $^{0,2}A_3$ (m/z 443,2) und $^{0,2}A_2$ (m/z 281,1). Auch $^{0,2}A$ -Typ-Ringbrüche mit zusätzlicher Eliminierung von Wasser sind in den Spektren zu beobachten. Dabei handelt es sich um die Fragmente $^{0,2}A_4-H_2O$ (m/z 587,2), $^{0,2}A_3-H_2O$ (m/z 425,2) und $^{0,2}A_2-H_2O$ (m/z 263,1).

Unter Verwendung der CID (Abb. 8.5) werden bei [MP-Rh110 - H]⁻ qualitativ die gleichen Fragmente gebildet wie bei der VisPD. In keinem der beiden Fragmentspektren sind Signale zu bemerken, die von Labelfragmenten ohne Saccharidanteil verursacht werden.

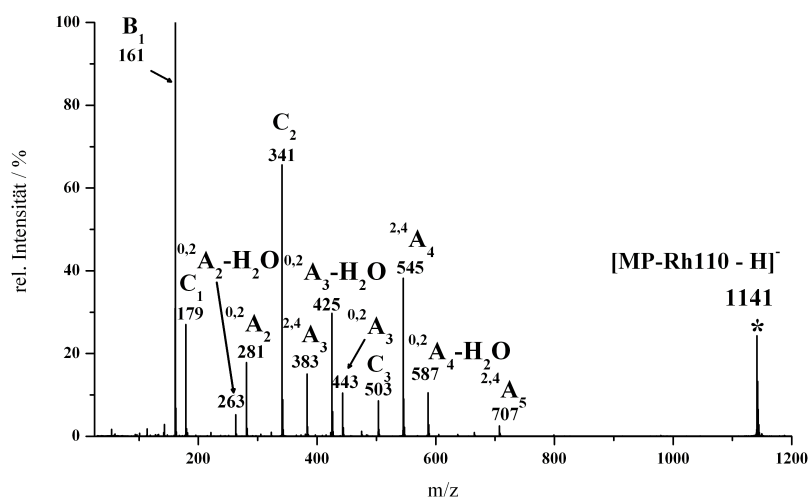


Abbildung 8.3: VisPD-Spektrum von [Maltopentaose-Rhodamin110 - H]⁻ (m/z 1141,4).

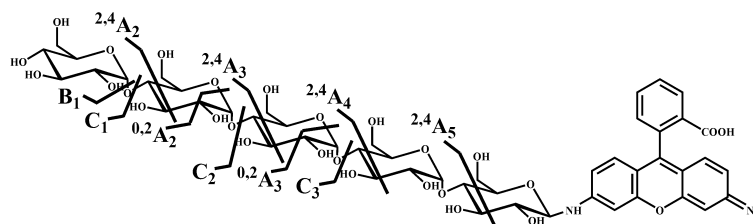


Abbildung 8.4: Fragmente von $[\text{MP-Rh110-H}]^-$ und $[\text{MP-2AT-H}]^-$ bei der CID und VisPD.

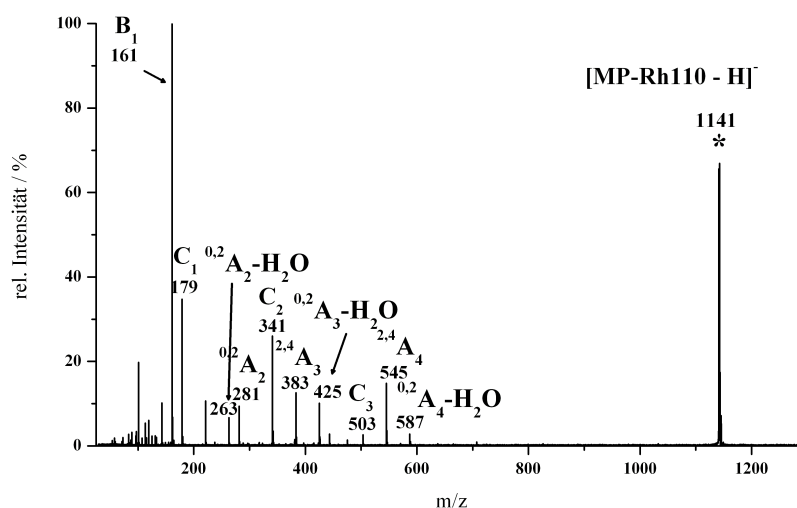


Abbildung 8.5: CID-Spektrum von [Maltopentaose-Rhodamin110-H]⁻ (1141.4 m/z).

VisPD und CID von [Maltopentaose-2-Aminoazotoluol - H]⁻

Das deprotonierte Derivat [MP-2AT-H]⁻ (m/z 1036,4) fragmentiert ebenfalls bei geringer Laserleistung (0,2 W, 488 nm) (Abb. 8.6). Das Ion weist bei der VisPD und der CID (Abb. 8.7) ähnliche Fragmentensignale auf wie das vergleichbare Rh110-Derivat (Abb. 8.3 und Abb. 8.5). Es werden ausschließlich Fragmente gebildet, die den Verlust des Labels aufweisen. Erneut treten, wie bei dem Rh110-Derivat, die C-Typ-Ionen bei m/z 503,2 (C₃), m/z 341,1 (C₂) und m/z 179,1 (C₁) auf, begleitet von einem intensiven B₁-Fragment bei m/z 161,1. Zusätzlich zu den glycosidischen Bindungsbrüchen sind Ringbrüche zu erkennen. Dazu gehören die ^{2,4}A-Typ-Ringbrüche ^{2,4}A₄ (m/z 545,2), ^{2,4}A₃ (m/z 383,1), ^{2,4}A₂ (m/z 281,1) und die ^{0,2}A-Typ-Ringbrüche ^{0,2}A₃ (m/z 443,2) und ^{0,2}A₂ (m/z 281,1). Auch ^{0,2}A-Typ-Ringbrüche mit zusätzlicher Eliminierung von Wasser sind wieder in dem Spektrum zu beobachten. Dabei handelt es sich um die Ionen ^{0,2}A₄-H₂O (m/z 587,2),

$^{0,2}\text{A}_3\text{-H}_2\text{O}$ (m/z 425,2) und $^{0,2}\text{A}_2\text{-H}_2\text{O}$ (m/z 263,1). Unter Verwendung der CID als Anregungsmethode (Abb. 8.7) werden die gleichen Fragmente gebildet wie bei der VisPD.

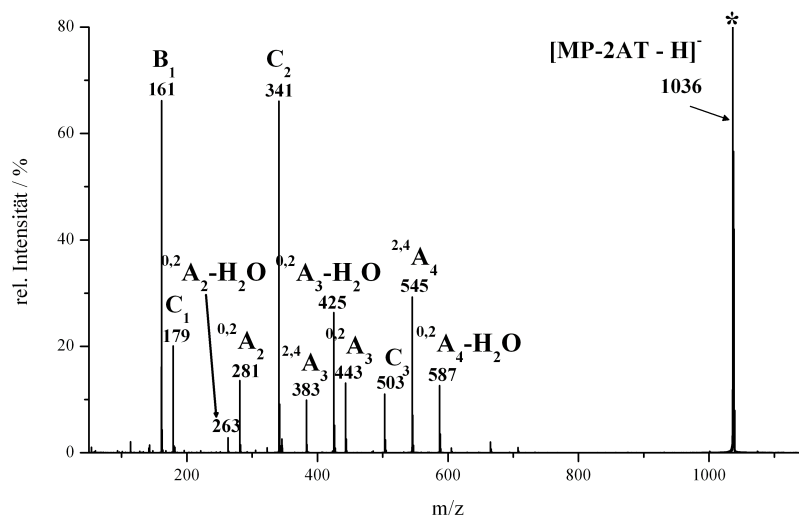


Abbildung 8.6: VisPD-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-2AT} - \text{H}]^-$ (m/z 1036,4).

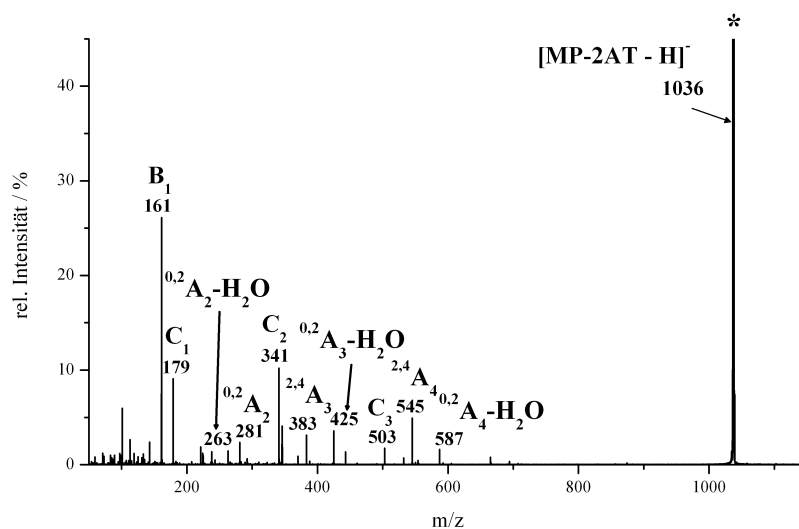


Abbildung 8.7: CID-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-2-Aminoazotoluol} - \text{H}]^-$ (m/z 1036,4).

8.2 LNFP I und LNFP II

CID von [LNFP I - H]⁻ und [LNFP II - H]⁻

In den CID-Spektren der underivatisierten Isomere [LNFP I - H]⁻ (m/z 852,3) und [LNFP II - H]⁻ (m/z 852,3) sind nur wenige Signale zu erkennen (Abb. 8.8). Wie bei der Maltopentaose findet eine ausgeprägte C-Typ-Fragmentierung statt (Abb. 8.9). In dem Spektrum von LNFP I sind mit höheren Intensitäten (über 10 %) nur die C-Typ-Ionen C₄ (m/z 690,3), C₃ (m/z 528,2) und C₂ (m/z 325,1) zu sehen. Bei der CID von LNFP II werden, anders als bei der LNFP I, neben den C-Typ-Fragmenten C₃ (690,3 m/z) und C₂ (m/z 528,2) auch die inneren Ionen C₂/Z_{3α} (m/z 348) gebildet. Bei der LNFP II erfolgt jedoch keine Eliminierung des GlcNAc, wie es wiederum bei der LNFP I (C₂) der Fall ist. Die Isomere können somit auch underivatisiert massenspektrometrisch unterschieden werden, allerdings sind in den signalarmen Spektren nur wenige strukturelevante Informationen enthalten.

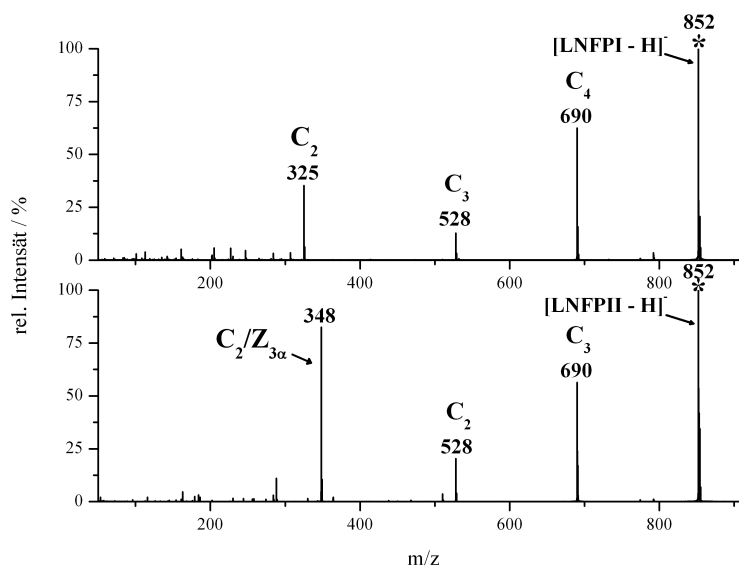


Abbildung 8.8: CID-Spektren von (oben) [LNFP I - H]⁻ und (unten) [LNFP II - H]⁻ (beide 852,3 m/z).

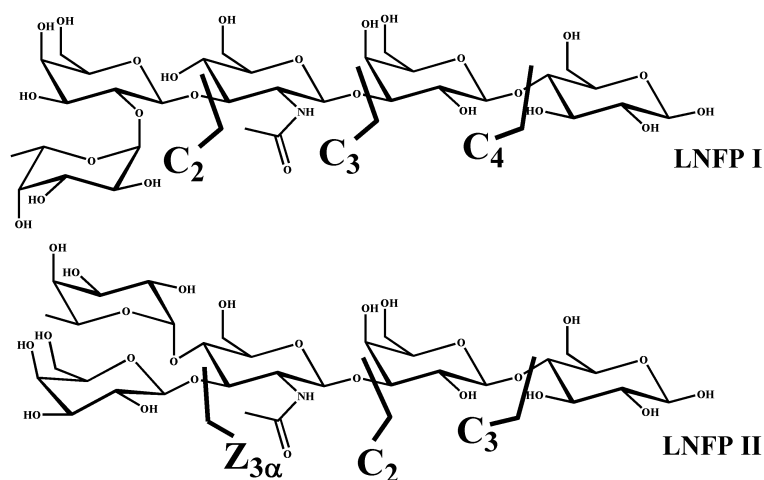
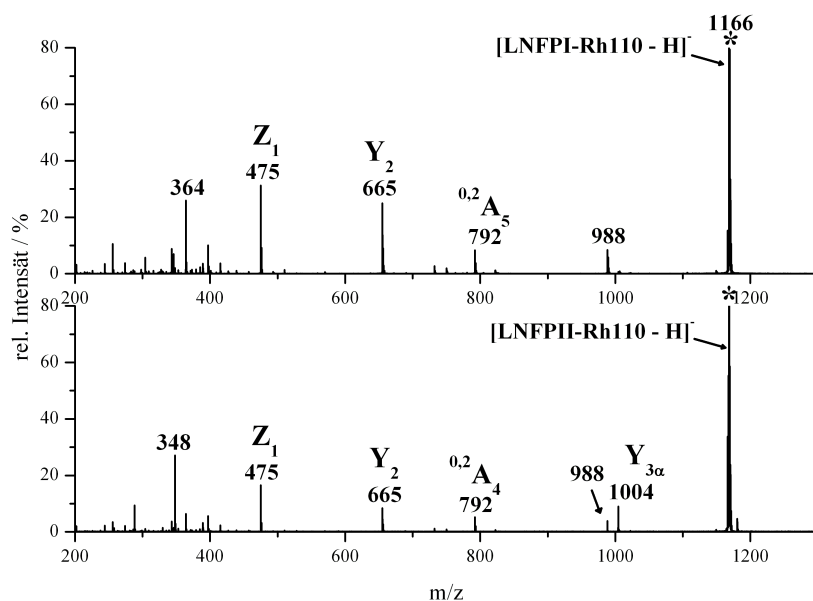


Abbildung 8.9: Fragmente von $[\text{LNFPI-H}]^-$ und $[\text{LNFP II-H}]^-$ bei der CID.

VisPD und CID von $[\text{LNFPI-Rh110-H}]^-$ und $[\text{LNFP II-Rh110-H}]^-$

Die VisPD-Spektren von $[\text{LNFPI-Rh110-H}]^-$ (m/z 1166,4) und $[\text{LNFP II-Rh110-H}]^-$ (m/z 1166,4) sind in Abb. 8.10 dargestellt.



n

Abbildung 8.10: VisPD-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rhodamin110-H}]^-$ und (unten) $[\text{LNFP II-Rhodamin110-H}]^-$ (beide m/z 1166,4).

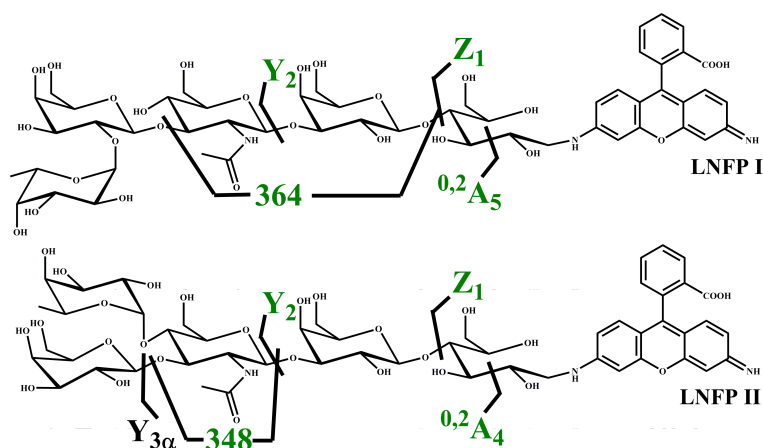


Abbildung 8.11: Fragmente von (oben) [LNFPI-Rh110-H]⁻ und (unten) [LNFPII-Rh110-H]⁻. Fragmente die bei der CID und VisPD gebildet werden sind grün dargestellt. Bindungsbrüche, die nur bei der VisPD auftreten, sind schwarz eingezeichnet. Für die Signale bei m/z 364 und m/z 348 ist jeweils nur ein mögliches Fragment eingezeichnet.

Im Gegensatz zu den Massenspektren der protonierten Oligosaccharide, die ausschließlich Fragmente mit Label aufweisen, werden in den Massenspektren der Anionen auch Fragmente ohne Label beobachtet (Abb. 8.11). Ionen, die durch Fragmentierung von der nichtreduzierenden Seite des Oligosaccharids gebildet werden, sind bei m/z 665,2 (Y₂) und m/z 475,2 (Z₁) zu finden. Ein Fragment bei dem das Label eliminiert wurde kann bei m/z 792,3 (0,2A₅) beobachtet werden. Das Signal bei m/z 988,3 konnte bisher nicht zugeordnet werden.

Bei der Betrachtung der Spektren von [LNFPI-Rh110-H]⁻ und [LNFPII-Rh110-H]⁻ fallen signifikante Unterschiede auf. LNFPI weist ein intensives Signal bei m/z 364,1 auf. In dem Spektrum der LNFPII ist dieses intensive Singal nicht zu beobachten, dafür weist das Isomer ein Fragmentensignal bei m/z 348,1 auf. Die Bildung dieser unterschiedlichen Massensignale liegt in der Struktur der Isomere begründet. Bei LNFPI kann das Signal bei m/z 364,1 einem inneren GlcNAc-Gal-Rest (B/Y oder C/Z) zugeordnet werden. Das Massensignal bei LNFPII (m/z 348,1), welches auch im CID-Spektrum der underivatisierten Substanz zu erkennen ist, kann einem inneren Fragment, bestehend aus einem GlcNAc und einer Fucose, zugeordnet werden (C₂/Z_{3α} oder B₂/Y_{3α}). Auch das Fragment Y_{3α} (m/z 1004,3) ist isomerenspezifisch und wird nur bei der LNFPII gebildet.

Anders als bei den Maltopentaose-Derivaten unterscheiden sich die CID-Spektren der LNFPI-Derivate von den VisPD-Spektren (Abb. 8.12). Die Signale bei m/z 988,3 und

das Fragment $Y_{3\alpha}$ (LNFP II) sind in den CID-Spektren nicht zu erkennen.

Die Fragmente Y_2 (m/z 665,2), Z_1 (m/z 475,2) und $^{0,2}A_5$ (m/z 792,3) werden mit relativ ähnlichen Intensitäten gebildet. Die isomerenspezifischen Signale bei m/z 364,1 (LNFP I) und m/z 348,1 (LNFP II) sind nur mit geringen Intensitäten (unter 10 %) vorhanden. Anders als bei der VisPD ist bei der CID eine Unterscheidung der Isomere nur anhand relativ unintensiver Fragmente möglich.

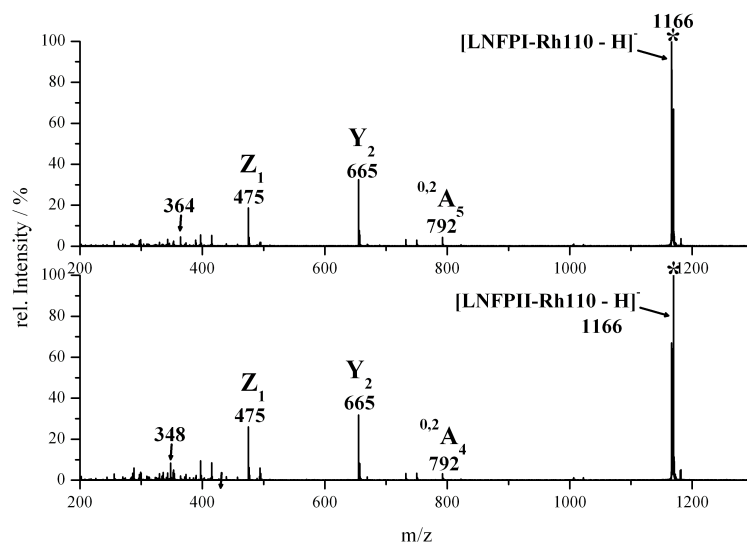


Abbildung 8.12: CID-Spektren von (oben) $[LNFP\text{I-Rhodamin110-H}]^-$ und (unten) $[LNFP\text{II-Rhodamin110-H}]^-$ (beide m/z 1166,4).

8.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

VisPD

Die Fragmentierung der deprotonierten Derivate MP-Rh110, MP-2AT, LNFP I-Rh110 und LNFP II-Rh110 erfolgt schon bei geringen Laserintensitäten (0,2 W, 488 nm). Mit der PD können signalintensive Spektren erhalten werden, die sequenzspezifische Fragmente aufweisen. In den Spektren von LNFP I und LNFP II konnten zusätzlich isomerenspezifische Fragmente identifiziert werden, mit deren Hilfe eine Unterscheidung der beiden Oligosaccharide möglich ist.

Bei der VisPD der deprotonierten Maltopentaose-Derivate wurden glycosidische Bindungsbrüche und Ringbrüche beobachtet. Die Fragmentierung erfolgt von der reduzie-

renden Seite des Oligosaccharids, wobei alle Fragmente den Verlust des Labels aufweisen. Bei den glycosidischen Bindungsbrüchen handelt es sich um C-Typ-Fragmente und ein B₁-Fragment. Die C-Typ-Fragmentierung ist bei der CID der bevorzugte glycosidische Fragmentierungsweg von unverzweigten Oligosacchariden.[94, 95, 89] Zu den Ringbruchfragmenten gehören ^{2,4}A- und ^{0,2}A-Typ-Fragmente. Diese Ringbruchsignale sind typisch für 1-4-verknüpfte Oligosaccharide, wie die Maltopentaose.[64, 92]

Die Oligosaccharid-Derivate von LNFP I und LNFP II zeigen bei der VisPD unerwartete Fragmentierungsmuster. Es sind ausschließlich Fragmente zu beobachten, die auf einen einzelnen Bindungsbruch zurückzuführen sind. Bei dem beobachteten ^{0,2}A₅-Fragment wird nur eine Bindung im Ring gebrochen, alle anderen Fragmente gehen auf glycosidische Bindungsbrüche zurück. Dazu gehören Y- und Z-Typ-Fragmente, die noch das Label enthalten und innere Fragmente ohne Label. Diese inneren Fragmente werden isomerenspezifisch gebildet. Bei der LNFP II findet zusätzlich der Verlust der endständigen Galactose (m/z 1004,3) statt. Dies verursacht ebenfalls ein isomerenspezifisches Signal. Bei der LNFP I ist die Galactose nicht endständig und diese Eliminierung wird nicht beobachtet. Der Verlust der Fucose, die bei den protonierten Isomeren auftritt, ist bei den Anionen nicht zu bemerken. Dies wurde bereits bei verschiedenen anionischen Sacchariden mit endständiger Fucose beobachtet.[90, 91, 89]

Das Signal bei m/z 988,3, welches nur bei der VisPD, jedoch nicht bei der CID auftritt, konnte bisher nicht zugeordnet werden. Es wird durch den Verlust einer neutralen Masse von 178,1 Da gebildet. Dieser Verlust entspricht C₆H₁₀O₆. Es kann sich dabei um eine Galactose und zwei Wasserstoffatome handeln. Ein solcher Verlust ist jedoch bei LNFP I nur mit einer vorherigen Umlagerung der Fucose denkbar. Diese glycosidische Fucoseumlagerung wird gewöhnlich nur bei protonierten Ionen beobachtet (siehe Abschn. 3.2.4) und wurde auch bei dem protonierten LNFP I-Rh110 und LNFP II-Rh110 bemerkt (siehe Abschn. 5.2).

Vergleich VisPD und CID

Die MS/MS-Spektren von MP-Rh110 und MP-2AT weisen qualitativ und quantitativ sehr ähnliche Signale auf. Auch zwischen den beiden Fragmentierungsmethoden, der VisPD und der CID, konnten keine signifikanten Unterschiede in den Spektren festgestellt werden.

Die Rh110-Derivate von LNFP I und LNFP II weisen, je nach Anregungsmethode, unterschiedliche Fragmentierungsmuster auf. In den VisPD-Spektren ist eine größere Anzahl an Signalen zu beobachten als in den CID-Spektren. Dazu gehören das Signal bei

m/z 1004,3 (LNFP II: Y_{3α}). Die inneren Ionen besitzen in den CID-Spektren geringere Intensitäten als in den VisPD-Spektren. Auch bei den Anionen erfolgt die Fragmentierung mittels CID selektiver und an den schwächsten Bindungen (z.B. Y₂-Fragmentierung). Bei der VisPD erfolgt die Fragmentierung wiederum weniger selektiv.

Einfluss des Labels

Bei der CID der underivatisierten Maltopentaose werden wenige Ringbrüche beobachtet, wobei diese noch dazu geringe Signalintensitäten aufweisen. Im Unterschied dazu werden bei den derivatisierten Oligosacchariden MP-Rh110 und MP-2AT bei der CID und VisPD einige intensive ^{2,4}A- und ^{0,2}A-Typ-Ringbruchionen gebildet. Bei den Derivaten wird die C-Typ-Fragmentierung, die näher an dem reduzierenden Ende des Saccharids stattfindet, mit geringerer Intensität beobachtet oder findet, wie im Falle des C₄-Fragments, nicht statt.

Zwischen den MS/MS-Spektren der beiden unterschiedlichen Derivate sind, sowohl bei der CID als auch der VisPD, nur wenige Unterschiede zu erkennen.

Bei den isomeren Oligosacchariden LNFP I und LNFP II besitzt das Label ebenfalls einen Einfluss auf die Fragmentierung. Die underivatisierten Saccharide fragmentieren bei der CID sukzessive von der nicht-reduzierenden Seite. Dies resultiert in C-Typ-Fragmenten. Das Z_{3α}-Fragment, welches durch einen Bindungsbruch am verzweigten Monomer (GlcNAc) gebildet wird, kann bei der underivatisierten LNFP II beobachtet werden. Die underivatisierten Isomere können mit Hilfe der CID-Spektren unterschieden werden, jedoch bieten die Spektren nur wenige strukturelevante Signale.

Die Verwendung des Labels Rh110 ändert das Fragmentierungsverhalten des Saccharids deutlich. Es treten nun zusätzlich innere Fragmente und Y-Typ-Fragmente auf. Bei beiden Isomeren tritt ein Z-Typ-Fragment an einem unverzweigten Saccharidring auf.

Bei underivatisierten Strukturen findet die Deprotonierung am reduzierenden Ende des Saccharids statt.[90, 91, 89] Diese Ladung induziert sukzessive die Eliminierung des endständigen Monomers. Dabei wird als Fragment ein Oligosaccharid gebildet, welches wieder am reduzierenden Ende die Ladung trägt und weiter fragmentieren kann. Die Derivatisierung der Oligosaccharide erschwert die Deprotonierung an dieser Position und sie findet nun auch an anderen Hydroxygruppen des Oligosaccharids statt, wodurch die Fragmentierung an anderen Bindungen induziert wird.

Kapitel 9

9 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

VisPD

Die VisPD von derivatisierten Oligosacchariden konnte erstmals sowohl für positive wie negative Ionen mit großem Erfolg durchgeführt werden. Die Kombination eines cw Argon-Ionen Lasers mit dem FT-ICR-MS erweist sich als einfaches und stabiles Setup. Die Kombination der PD-Methode mit einem FT-ICR-MS besitzt gegenüber der CID mehrere Vorteile. Bei der PD wird, anders als bei der CID, kein Stoßgas in die Zelle gepulst und die Ionen werden vor der Detektion nicht in höhere Radien angeregt.[9, 146] Bei Verwendung der VisPD ist, auch nach längeren Messzeiten, keine größere Beeinträchtigung des Ultrahochvakuums festzustellen. Bei CID-Messungen hingegen erhöht sich nach wenigen Stunden Messzeit der Druck in der ICR-Zelle deutlich und das UHV benötigt eine Regenerationsphase.

Die derivatisierten Oligosaccharide fragmentieren bei der VisPD schon bei geringen Laserleistungen von 0,2 W und weisen zahlreiche Oligosaccharidfragmente mit guten Signalintensitäten auf. Die Intensitäten der Vorläuferionen und der Fragmente können sehr einfach durch die eingestellte Laserleistung variiert werden.

Maltopentaose wurde mit verschiedenen Chromophoren derivatisiert und mittels VisPD fragmentiert, wobei insbesondere die Rhodamin 110- und 2-Aminoazotoluol-Derivate gute Derivatisierungs- und Fragmentierungseigenschaften aufweisen. Allgemein bieten die Derivate signalreiche Spektren mit einer hohen Anzahl von sequenzspezifischen Fragmenten. Auch ein Cluster aus LNFP II und AMQ kann mittels VisPD fragmentiert werden, wobei jedoch nur wenige Fragmente gebildet werden.

Die chromophoren Gruppen besitzen einen deutlichen Einfluss auf die Bildung der Fragmenten. Bei $[\text{LNFP I-AMQ}+\text{H}]^+$ werden, anders als bei der vergleichbaren Rh110-Spezies $[\text{LNFP I-Rh110}+\text{H}]^+$, auch innere Fragmente gebildet, welche den Verlust des Labels aufweisen. Dieses Verhalten kann durch die geringere Basizität des AMQ im Vergleich zu Rh110 verursacht werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ionenspezies des Derivats einen noch größeren Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten der Vorläuferionen besitzt, als das Chromophor. Verschiedene Ionenspezies von LNFP I-Rh110 und LNFP II-Rh110 wurden fragmentiert, dazu gehören $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$, $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, $[\text{M}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$, $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ und $[\text{M}-\text{H}]^-$. Die Fragmente aller Spezies gehen bei der VisPD überwiegend auf glycosidische Bindungsbrüche zurück und nur wenige Ringbrüche finden statt. Eine Ausnahme stellt dabei die Spezies $[\text{MP}-\text{H}]^-$ dar, die bei der VisPD eine große Anzahl von Ringbruchfragmenten aufweist. Die protonierten Spezies LNFP I-Rh110, LNFP II-Rh110 und MP-Rh110 fragmentieren überwiegend von der nicht-reduzierenden Seite des Oligosaccharids, was zu Y-Typ-Ionen, und bei der Maltopentaose zusätzlich zu A-Typ-Ionen führt. In den Spektren der Spezies $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$, $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ werden B- und Y-Typ-Ionen, aber auch C-Typ-Ionen und ein $^{0,1}\text{A}$ -Bindungsbruch beobachtet. Die VisPD Spektren der zweifach geladenen Ionen $[\text{M}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$, $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ und $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ bieten die meisten strukturelevanten Signale. Es werden zahlreiche intensive B- und Y- und weniger intensive Z und C-Typ-Ionen beobachtet. In den Fragmentspektren der LNFP I- und LNFP II-Derivate sind auch isomerenspezifische Fragmente zu erkennen, mit deren Hilfe die Isomere unterschieden werden können.

In den PD-Spektren der deprotonierten LNFP-Derivate sind überwiegend Fragmentensignale zu beobachten, die auf glycosidische Bindungsbrüche zurückgehen. Dazu gehören Y- und Z-Fragmente, die noch das Label enthalten und innere Fragmente ohne Label. Anhand der inneren Fragmente und dem $\text{Y}_{3\alpha}$ -Ion bei LNFP II, ist auch bei den deprotonierten Spezies eine Unterscheidung der beiden Isomeren möglich.

Die VisPD bietet somit, je nach verwendeter Ionenspezies, unterschiedliche Fragmente mit strukturelevanten Informationen und teilweise isomerenspezifischen Signalen.

Vergleich der VisPD mit der CID

Im Allgemeinen werden in den VisPD-Spektren eine größere Anzahl an Fragmenten beobachtet als in den CID-Spektren. Es ist davon auszugehen, dass die VisPD eine höherenergetische Anregungsmethode als die CID ist, weshalb die Fragmentierung weniger

selektiv erfolgt. Bei der CID wird die innere Energie durch eine große Anzahl von Stößen erhöht und die Fragmentierung erfolgt selektiver und in höherem Ausmaß an der schwächsten Bindung des Moleküls.

In den MS/MS-Spektren der Spezies $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ werden nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Anregungsmethoden beobachtet. Dabei handelt es sich überwiegend um unterschiedliche Signalintensitäten der Fragmente. Bei den zweifach geladenen Ionen $[M+H+Me]^{2+}$ ($Me = Li, Na$ oder K) und $[M+2Na]^{2+}$ werden auch qualitativ sehr verschiedene Fragmentspektren erhalten. Dabei weisen die VisPD-Spektren eine deutlich größere Anzahl an unterschiedlichen Fragmenten auf. Auch in den CID-Spektren der deprotonierten Spezies sind weniger Fragmente zu beobachten als in den VisPD-Spektren.

Fragmentierung von Adduktionen

LNFP I und LNFP II besitzen hohe Affinitäten zu Alkali- und Erdalkalitionen. Die verschiedenen Adduktionen sind unterschiedlich stabil und weisen ein unterschiedliches Fragmentierungsverhalten auf. Aufgrund ihrer isomeren Strukturen komplexieren die Saccharide Kationen an verschiedenen Positionen. Dadurch können alternative Bindungsbrüche und isomerenspezifische Fragmente entstehen.

Bei der Zugabe der Additive Li^+ , Na^+ und K^+ sind die jeweiligen Spezies $[M+H+Me]^{2+}$ der LNFP I-Rh110 und LNFP II-Rh110 die intensivsten Ionen im Spektrum. Aufgrund des Fragmentierungsmusters der Ionen ist davon auszugehen, dass die Protonierung an der chromophoren Gruppe stattfindet und die Komplexbildung des Metallions in der Nähe der GlcNAc-Einheit, wobei wahrscheinlich die N-Acetylgruppe an der Komplexbildung beteiligt ist.

Die Spektren der Spezies $[M+H+Li]^{2+}$ und $[M+H+Na]^{2+}$ weisen sehr ähnliche Fragmentensignale auf. Dies wurde auch bei den einfach geladenen Spezies $[M+Li]^+$ und $[M+Na]^+$ der unterivatisierten Saccharide beobachtet und wird allgemein auf einen ähnlichen Fragmentierungsweg von Li- und Na-Adduktionen zurückgeführt.[80, 12] K-Adduktionen weisen ein davon abweichendes Fragmentierungsverhalten auf.

Bei der Zugabe verschiedener Additive (Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+}) zu den unterivatisierten Oligosacchariden LNFP I und LNFP II bilden sich unterschiedliche Spezies, darunter auch die Oligosacchariddimere und -trimere $[2M+H+K]^{2+}$, $[2M+H+Na]^{2+}$, $[2M+H+NH_4]^{2+}$, $[2M+Ba]^{2+}$, $[2M+Sr]^{2+}$, $[3M+H+K]^{2+}$, $[3M+Ba]^{2+}$ und $[3M+Sr]^{2+}$. Die Dimere $[2M+H+K]^{2+}$ besitzen eine auffällige Stabilität und ein außergewöhnliches Fragmentierungsmuster. Anders als bei den monomeren Spezies $[M+H]^+$ und $[M+K]^+$

sind zahlreiche, auch isomerenspezifische, Fragmente in den Spektren zu erkennen. Es werden sogar Dimerfragmente beobachtet, die aus zwei Oligosaccharidmolekülen aufgebaut sind, welche die Eliminierung von einer oder zwei Fucose-Einheiten aufweisen. Dabei werden kovalente Bindungen gebrochen, wobei die komplexen Bindungen erhalten bleiben. Solch ein Fragmentierungsmuster ist nur bei den Dimeren $[2M+Ba]^{2+}$ und $[2M+Sr]^{2+}$ zu erkennen. Im Allgemeinen bilden sich die Dimere, wenn die Kationenradien der zugegebenen Metalle zwischen 113 pm und 164 pm liegen. Ein auffälliges Fragmentierungsverhalten mit Dimerfragmenten wird bei Ionenradien zwischen 132 pm und 149 pm beobachtet.

Sowohl bei den CID- wie auch bei den VisPD-Experimenten können die Isomere LNFP I und LNFP II am einfachsten bei Fragmentierung der Adduktionen unterschieden werden. Bei der Verwendung unterschiedlicher Spezies ändert sich das Fragmentierungsverhalten und Fragmente mit unterschiedlichem Informationsgehalt werden erhalten. Besonders die K-Adduktionen, die gewöhnlich nicht als Vorläuferionen verwendet werden, weisen gute Fragmentierungseigenschaften auf. Die Spezies $[M+H+K]^{2+}$ der Rh110-Derivate und die Spezies $[2M+H+K]^{2+}$ der underivatisierten Oligosaccharide LNFP I und LNFP II werden mit hohen Intensitäten gebildet und fragmentieren unter Bildung zahlreicher Signale, die teilweise isomerenspezifisch sind.

Ausblick

Weitere Chromophore können zur Derivatisierung und VisPD verwendet werden. Die Verwendung eines Chromophors mit Säuregruppe kann bei negativer ESI zu einem alternativen Fragmentierungsverhalten und, im Falle eines MP-Derivats, zu Fragmenten führen, die das Label noch enthalten. Dabei ist besonders von Interesse, ob und in welchem Maße Ringbrüche stattfinden. Des Weiteren wurde von *Ko et al.* gezeigt, dass bei der UVPD die Derivatisierungsart einen Einfluss auf die Fragmentierung der Oligosaccharide besitzt.[126] Ob dieser Effekt auch bei der VisPD auftritt könnte durch die Verwendung eines geeigneten Hydrazin-Farbstoffs geklärt werden.

Einige dimere Cluster weisen eine außerordentlich hohe Stabilität auf, die sicherlich in ihrer dreidimensionalen Struktur begründet ist. Hierzu sollten weitere Fragmentierungsexperimente, welche die Lokalisierung der Metallionen untersuchen, sowie semiempirische Rechnungen unternommen werden. Auch die Bildungsbedingungen der Cluster sind von großem Interesse. Bisher konnte gezeigt werden, dass Wasser als ESI-Lösung eine Clusterbildung begünstigt. Welche anderen Parameter die Bildung der Dimere verstärken oder verhindern, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Auch die Verwendung weiterer Ionen, z.B. Mg^{2+} und Ca^{2+} , als Additive ist denkbar.

A

Derivatisierung und Fragmentierungsverhalten

Oligosaccharide weisen im visuellen Bereich des elektromagnetischen Spektrums keine Absorption auf. Zur Fragmentierung mit visuellem Licht ist daher die Verwendung einer absorbierenden, chromophoren Gruppe erforderlich.

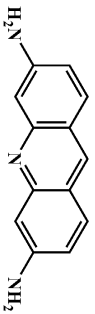
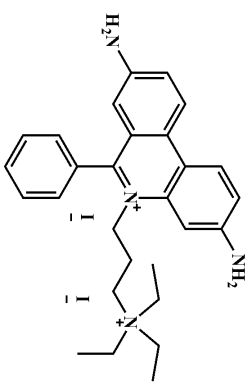
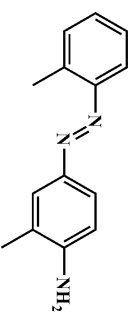
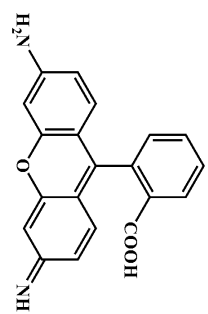
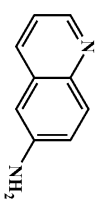
A.1 Derivatisierung der Oligosaccharide

Vis-aktive Chromophore wurden, wie es auch bei der UVPD üblich ist, kovalent an Saccharide gebunden.[16, 60] Als Derivatisierungsmethode wurde die reduktive Aminierung verwendet.

A.1.1 Auswahl der Chromophore

Chromophore, die im Bereich zwischen 450 nm und 520 nm absorbieren und primäre Aminogruppen besitzen, kommen als Derivatisierungsmittel in Betracht. Ausgewählte Chromophore mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften (Ladung, Masse, Lage der Absorptionsmaxima) wurden unter Vis-Einstrahlung auf ihr Fragmentierungsverhalten untersucht. Die Chromophore Proflavin, 2-Aminoazotoluol, Rhodamin 110 und Propidiumiodid fragmentieren unter Vis-Einstrahlung und wurden für die Derivatisierung der Oligosaccharide Maltopentaose, LNFPI und LNFPII verwendet. Das Chromophor 6-Aminoquinolin konnte aufgrund der kleinen Masse nicht im ICR-MS unter Vis-Einstrahlung fragmentiert werden. Jedoch fragmentiert der Cluster $[\text{LNFPII}+\text{AMQ}+\text{H}]^+$ (Abb. 5.18). Das Chromophor wurde ebenfalls zur Derivatisierung

Tabelle A.1: Chromophore, die zur Derivatisierung von Maltopentaose, LNFP I oder LNFP II verwendet wurden.

Struktur	Name (verwendete Abkürzung)	Masse / $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Akkurate Masse / Da	Absorption in EtOH / nm
	Proflavin (PF)	209,3	209,1	449
	Propidiumiodid (PI)	682,4	682,1	533
	2-Aminoazotoluol (2AT)	225,3	225,1	503
	Rhodamin 110 (Rh110)	330,4	330,1	496
	6-Aminoquinolin (AMQ)	144,7	144,1	355

von LNFP I verwendet. In Tab. A.1 sind die verwendeten Label abgebildet und charakterisiert.

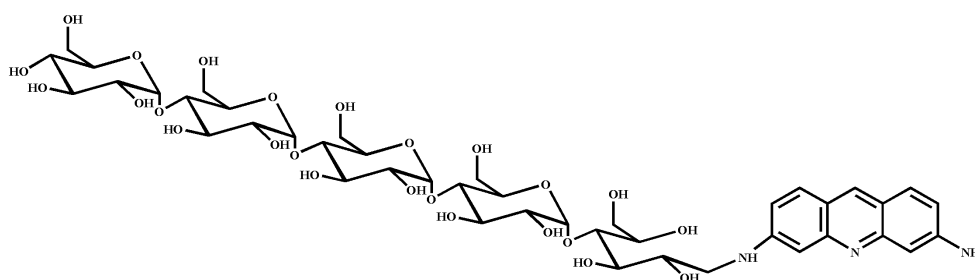
Die Chromophore Safranin T, 1-Amino-2-methylantraquinon, Acriflavin und Nilblau fragmentierten unter den gewählten Bedingungen weniger intensiv und wurden bisher nicht zur weiteren Derivatisierung verwendet (Abb. B.8). Von dem Chromophor 4-Amino-1,1'-azobenzol-3,4'-disulfonsäure fragmentiert nur die einfach deprotonierte Spezies, welche sich in geringer Intensität bildet.

A.1.2 Derivatisierung und Aufreinigung

Die Derivatisierung der Oligosaccharide wurde mit kleinen Änderungen nach *Westfall et al.* mittels reduktiver Aminierung durchgeführt.[139] Maltopentaose wurde mit PI, PF, 2AT und Rh110 derivatisiert. LNFP I und LNFP II wurden mit Rhodamin 110 und LNFP I wurde mit AMQ derivatisiert.

Zur Aufreinigung der Derivate wurde eine Festphasenextraktion (SPE) mit Oasis HLB-Kartuschen (hydrophiler-lipophiler Balance) verwendet. Das HLB Sorbent, ein Umkehrphasenmaterial, ist ein makroporöses Copolymer, hergestellt aus zwei Monomeren, dem lipophilen Divenylbenzol und dem hydrophilen N-Vinylpyrrolidon. Nach der SPE wurden die verschiedenen Fraktionen gesammelt und massenspektrometrisch untersucht. Weitere spektroskopische Untersuchungen können aufgrund der geringen Probenmengen nicht durchgeführt werden.

Derivatisierung von Maltopentaose-Proflavin (MP-PF)

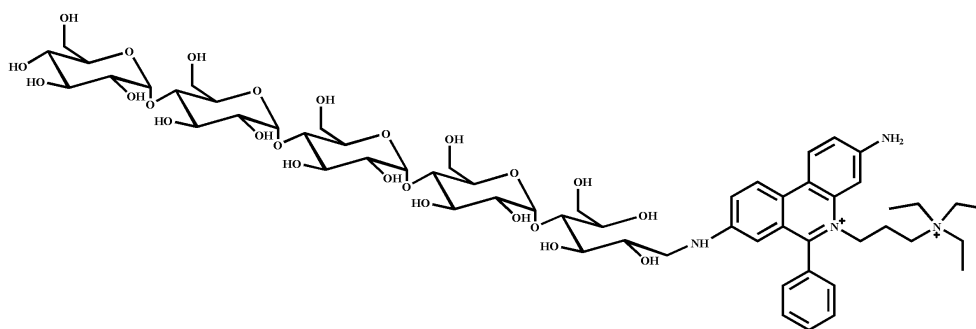


Derivatisierung: Es wurden 20 μ l 0,15 M Maltopentaose in H_2O (124,4 mg/ml) zu 20 μ l 1,5 M Proflavin-Lösung (314,0 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) gegeben. Die Mischung wurde mit 20 μ l frisch angesetzter 1,0 M $NaBH_3CN$ Lösung (62,3 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) versetzt und 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht.

A Derivatisierung und Fragmentierungsverhalten

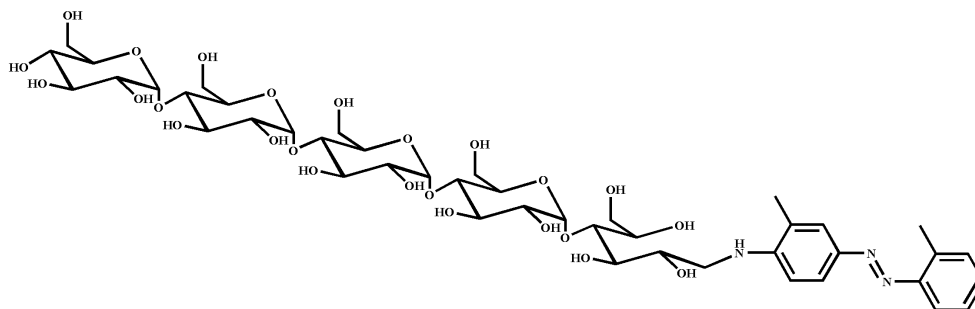
SPE: Vor Verwendung wurden die Oasis HLB-Kartuschen mit 2 ml ACN, gefolgt von 2 ml Wasser konditioniert. Das Reaktionsprodukt wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und auf die Kartuschen gegeben. Es wurde ein Waschschrift mit 1 ml Wasser durchgeführt und anschließend wurden 1 ml 5 % ACN (ACN:Wasser, 5:95 v/v), 1 ml 10 % ACN, 1 ml 15 % ACN, 1 ml 20 % ACN und 1 ml 25 % ACN auf die Säule gegeben. Das Produkt wurde mit 20 % ACN eluiert.

Derivatisierung von Maltopentaose-Propidiumiodid (MP-PI)



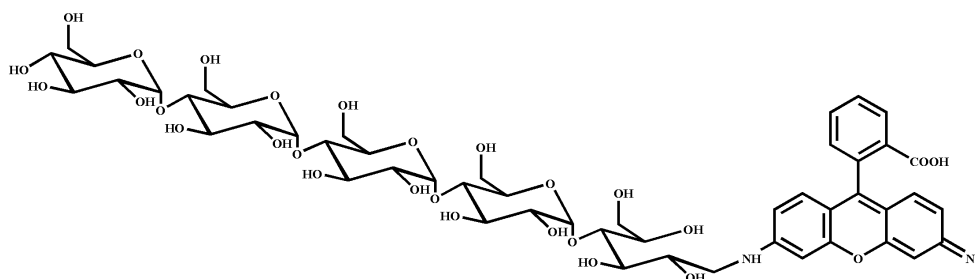
Derivatisierung: Es wurden 40 μ l 0,075 M Maltopentaose in H₂O (62,2 mg/ml) zu 40 μ l 0,075 M Propidiumiodid-Lösung (50,2 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) gegeben. Die Mischung wurde mit 40 μ l frisch angesetzter 1,0 M NaBH₃CN Lösung (62,3 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) versetzt und 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht.

SPE: Vor Verwendung wurden die Oasis HLB-Kartuschen mit 2 ml ACN, gefolgt von 2 ml Wasser konditioniert. Das Reaktionsprodukt wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und auf die Kartuschen gegeben. Es wurde ein Waschschrift mit 1 ml Wasser durchgeführt und anschließend wurden 1 ml 5 % ACN, 1 ml 10 % ACN, 1 ml 15 % ACN, 1 ml 20 % ACN, 1 ml 25 % ACN, 1 ml 30 % ACN auf die Säule gegeben. Das Produkt eluierte bei 25 % ACN, das Nebenprodukt Maltopentaose-Propidiumiodid-Maltopentaose (m = 2052,9 Da) wurde bei 5 % ACN eluiert.

Derivatisierung von Maltopentaose-2-Aminoazotoluol (MP-2AT)

Derivatisierung: Es wurden 20 μ l 0,15 M Maltopentaose in H_2O (62,2 mg/ml) zu 20 μ l 0,15 M 2-Aminoazotoluol-Lösung (33,8 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) gegeben. Die Mischung wurde mit 20 μ l frisch angesetzter 1,0 M NaBH_3CN Lösung (62,3 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) versetzt und 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht.

SPE: Vor Verwendung wurden die Oasis HLB-Kartuschen mit 2 ml ACN, gefolgt von 2 ml Wasser konditioniert. Das Reaktionsprodukt wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und auf die Kartuschen gegeben. Es wurde ein Waschschrift mit 1 ml Wasser durchgeführt und anschließend wurden 1 ml 5 % ACN, 1 ml 10 % ACN, 1 ml 15 % ACN, 1 ml 20 % ACN, 1 ml 25 % ACN, 1 ml 30 % ACN, 1 ml 40 % ACN und 50 % ACN auf die Säule gegeben. Das Produkt wurde mit 40 % ACN eluiert.

Derivatisierung von Maltopentaose-Rhodamin 110 (MP-Rh 110)

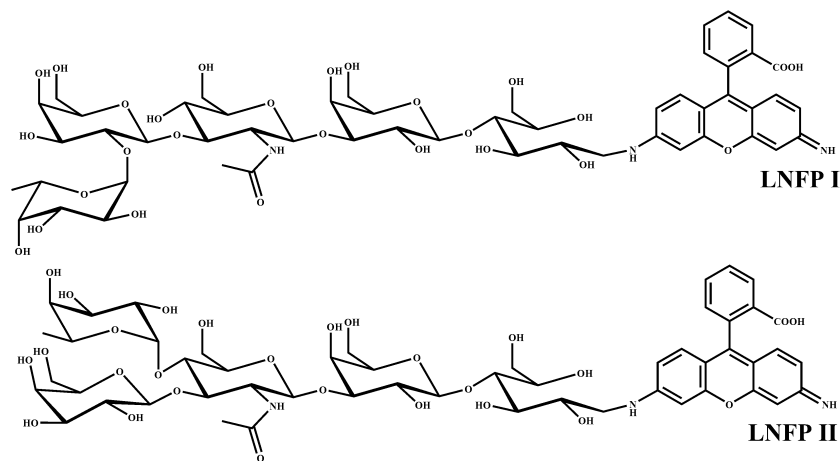
Derivatisierung: Es wurden 20 μ l 0,15 M Maltopentaose in H_2O (62,2 mg/ml) zu 20 μ l 0,15 M Rhodamin 110-Lösung (52,6 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) gegeben.

A Derivatisierung und Fragmentierungsverhalten

Die Mischung wurde mit 20 µl frisch angesetzter 1,0 M NaBH₃CN Lösung (62,3 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) versetzt und 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht.

SPE: Vor Verwendung wurden die Oasis HLB-Kartuschen mit 2 ml ACN, gefolgt von 2 ml Wasser konditioniert. Das Reaktionsprodukt wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und auf die Kartuschen gegeben. Es wurde ein Waschschriff mit 1 ml Wasser durchgeführt und anschließend wurden 1 ml 5 % ACN, 1 ml 10 % ACN, 1 ml 15 % ACN, 1 ml 20 % ACN, 1 ml 25 % ACN, 1 ml und 30 % ACN auf die Säule gegeben. Das Produkt wurde mit 25 % ACN eluiert.

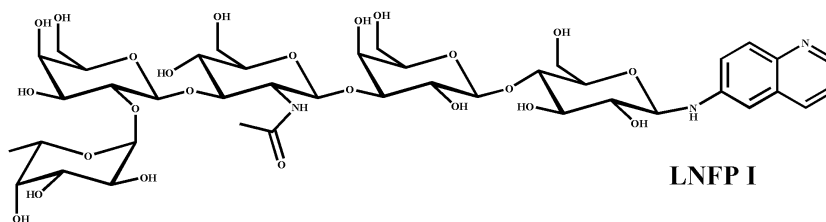
Derivatisierung von LNFP I-Rhodamin 110 (LNFP I-Rh110) und LNFP II-Rhodamin 110 (LNFP II-Rh110)



Derivatisierung: Es wurden 40 µl 0,01 M LNFP I oder LNFP II in H₂O (8,5 mg/ml) zu 40 µl 0,02 M Rhodamin 110-Lösung (6,6 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) gegeben. Die Mischung wurde mit 20 µl frisch angesetzter 1,0 M NaBH₃CN Lösung (62,3 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) versetzt und 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht.

SPE: Vor Verwendung wurden die Oasis HLB-Kartuschen mit 2 ml ACN, gefolgt von 2 ml Wasser konditioniert. Das Reaktionsprodukt wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und auf die Kartuschen gegeben. Es wurde ein Waschschriff mit 1 ml Wasser durchgeführt und anschließend wurden 0,5 ml 5 % ACN, 0,5 ml 10 % ACN, 0,5 ml 15 % ACN, 0,5 ml 20 % ACN, 0,5 ml 25 % ACN und 0,5 ml 30 % ACN auf die Säule gegeben. Das Produkt wurde mit 25 % ACN eluiert.

Derivatisierung von LNFP I-6-Aminoquinolin (LNFP I-AMQ)



Derivatisierung: Es wurden 40 μ l 0,01 M LNFP I in H_2O (8,5 mg/ml) zu 40 μ l 0,02 M Aminoquinolin-Lösung (2,9 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) gegeben. Die Mischung wurde mit 20 μ l frisch angesetzter 1,0 M $NaBH_3CN$ Lösung (62,3 mg/ml gelöst in 3:7 (v/v) Eisessig:DMSO) versetzt und 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht.

SPE: Vor Verwendung wurden die Oasis HLB-Kartuschen mit 2 ml ACN gefolgt von 2 ml Wasser konditioniert. Das Reaktionsprodukt wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und auf die Kartuschen gegeben. Es wurde ein Waschschritt mit 1 ml Wasser durchgeführt und anschließend wurden 0,5 ml 5 % ACN, 0,5 ml 10 % ACN und 0,5 ml 15 % ACN auf die Säule gegeben. Das Produkt wurde mit 5 % ACN eluiert.

A.2 Fragmentierungsverhalten der Derivate

A.2.1 Absorption und Fragmentierungsverhalten der Label

Bei der VisPD der Derivate ist zu berücksichtigen, dass die chemische Umgebung einen Einfluss auf das Absorptionsverhalten und die Fragmentierungseffizienzen der Chromophore ausübt. Eine Veränderung kann z.B. durch eine Derivatisierung, Protonierung, Deprotonierung oder der Bildung von Adduktionen verursacht werden.

Der Einfluss der Derivatisierung war besonders an den Fragmentierungseffizienzen der Rhodamin 110-Spezies zu erkennen. Im Falle des Rh110 fragmentiert das freie Label schwach bei Vis-Einstrahlung. Die Oligosaccharid-Derivate weisen jedoch auch bei geringen Laserleistungen eine hohe Fragmentierungseffizienz auf (siehe Abschn. A.2.2). Die Rh110-Cluster, die aus LNFP II und Rh110 aufgebaut sind, fragmentieren bei Vis-Bestrahlung nicht. In den UV-Spektren, die in EtOH aufgenommen wurden, wird bei den Rh110-Derivaten im Vergleich zu dem Rh110 eine Rotverschiebung festgestellt (Abb. A.1 und Abb. A.3, links).

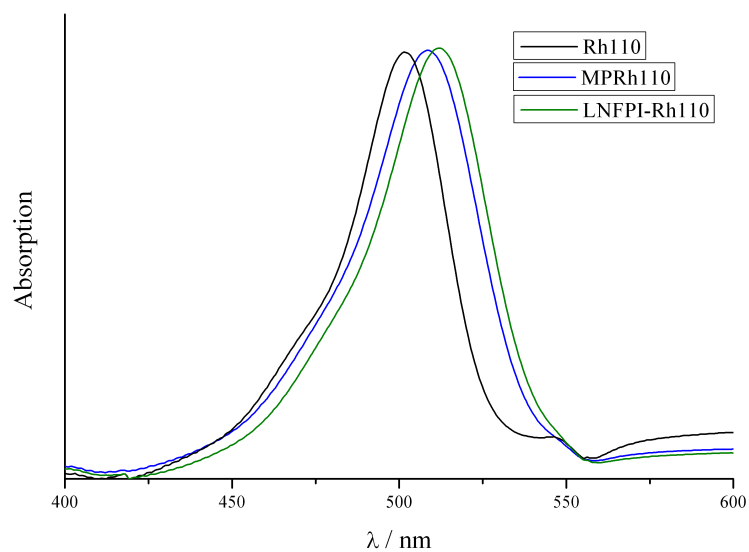


Abbildung A.1: UV-Spektrum in EtOH von Rhodamin 110 (Rh110), Maltopentaose-Rhodamin110 (MP-Rh110) und LNFPI-Rhodamin110 (LNFPI-Rh110).

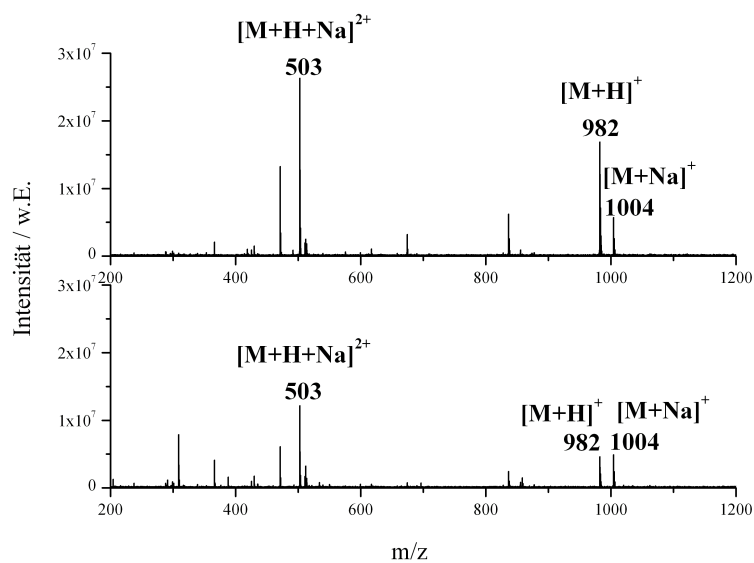


Abbildung A.2: Übersichtsspektren von LNFPI-6-Aminoquinolin in MeOH:H₂O (1:1); (oben) Übersichtsspektrum ohne Lasereinstrahlung und (unten) Übersichtsspektrum mit Vis-Einstrahlung (457,9 nm, 0,4 W).

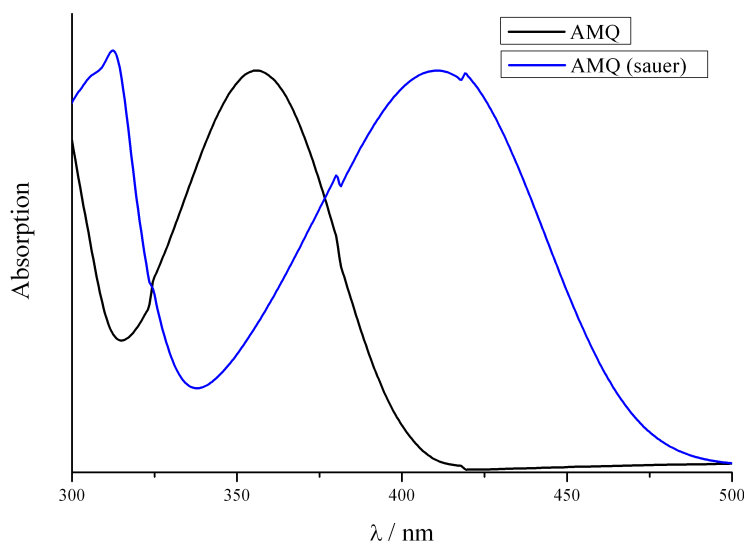


Abbildung A.3: UV-Spektrum von 6-Aminoquinolin in EtOH ohne Zugabe (AMQ: schwarz) und mit Zugabe von HCl (AMQ sauer: blau).

Die Fragmentierungseffizienz der verwendeten Farbstoffe wird noch deutlicher von der Ionenspezies beeinflusst. Bei der VisPD weisen die deprotonierten Spezies von Proflavin und AMQ keine Fragmentierung auf. Propidiumiodid kann aufgrund der positiven Ladung nicht im negativen Ionenmodus detektiert werden. Das Derivat LNFPI-AMQ fragmentiert nur in protonierter Form ($[\text{LNFPI-AMQ}+\text{H}]^+$) und das Natriumaddukt $[\text{LNFPI-AMQ}+\text{Na}]^+$ fragmentiert jedoch nicht (Abb. A.2). Auch in den gemessenen UV-Spektren des Chromophors ist zu erkennen, dass AMQ (in EtOH) bei 457,9 nm keine Absorption aufweist (Abb. A.3). Eine deutliche Rotverschiebung des Absorptionsmaximums ist bei der Zugabe von HCl zu erkennen.

A.2.2 Abhängigkeit der Fragmentierung von der Laserwellenlänge und der Laserleistung

Die VisPD der Spezies $[\text{MP-Rh110}+\text{H}]^+$ wurde bei den Wellenlängen 472,2 nm, 476,5 nm, 488,0 nm, 496,5 nm, 501,7 nm und 514,5 nm durchgeführt (Abb. A.5). Dabei wurde jeweils eine Laserleistung von 0,2 W verwendet. Im Massenbereich über m/z 400 sind Fragmente zu beobachten, die einen Saccharidanteil besitzen. Bei kleineren Massen sind Farbstofffragmente zu sehen. Qualitativ entstehen bei den verwendeten Wellenlängen die gleichen Saccharidfragmente, jedoch mit deutlich unterschiedlichen Signalintensitäten.

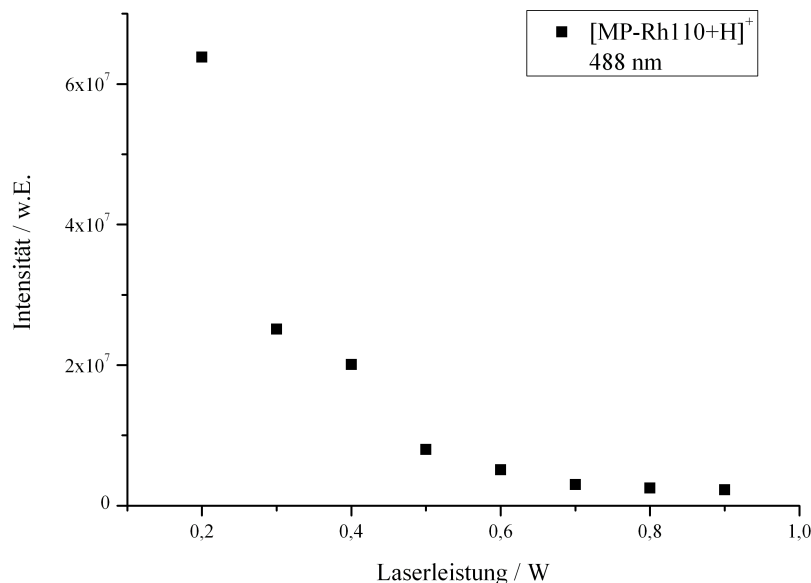


Abbildung A.4: Auftragung der Signalintensität von [Maltopentaose-Rhodamin110+H]⁺ gegen die Laserleistung bei 488 nm.

Aufgrund der guten Fragmentierungseffizienzen bei 488 nm wurde die VisPD der Rh110-Derivate bei dieser Wellenlänge durchgeführt.

Die Fragmentspektren von [MP-Rh110+H]⁺ wurden bei unterschiedlichen Laserleistungen aufgenommen. Die Laserleistungen wurden von der minimal einstellbaren Leistung von 0,2 W bis 0,9 W variiert. Es ist zu erkennen, dass die Signalintensität des Vorläuferions schon bei Laserleistung unter 0,4 W deutlich sinkt und das Ion bei 0,6 W fast vollständig fragmentiert (Abb. A.4). Zur Fragmentierung der Rhodamin110-Derivate genügen somit geringe Laserintensitäten. Dies gilt auch für die deprotonierte Spezies [MP-Rh110-H]⁻ (Abb. B.2). Im Folgenden wurde die VisPD von Rh110-Derivaten bei Laserleistungen zwischen 0,2 W und 0,4 W durchgeführt.

Ein gutes Fragmentierungsverhalten weisen auch die protonierten und deprotonierten 2AT-Derivate bei 488,0 nm auf. Die protonierten AMQ-Derivate wurden mit 0,4 W bei 457,9 nm bestrahlt und zeigen eine geringere Fragmentierungseffizienz (Abb. A.2). Die protonierten Propidiumiodid- und Proflavin-Derivate zeigen auch bei maximaler Laserleistungen geringe Fragmentierungseffizienzen. Die Fragmentspektren der Derivate werden in Abschn. 5.1 gezeigt.

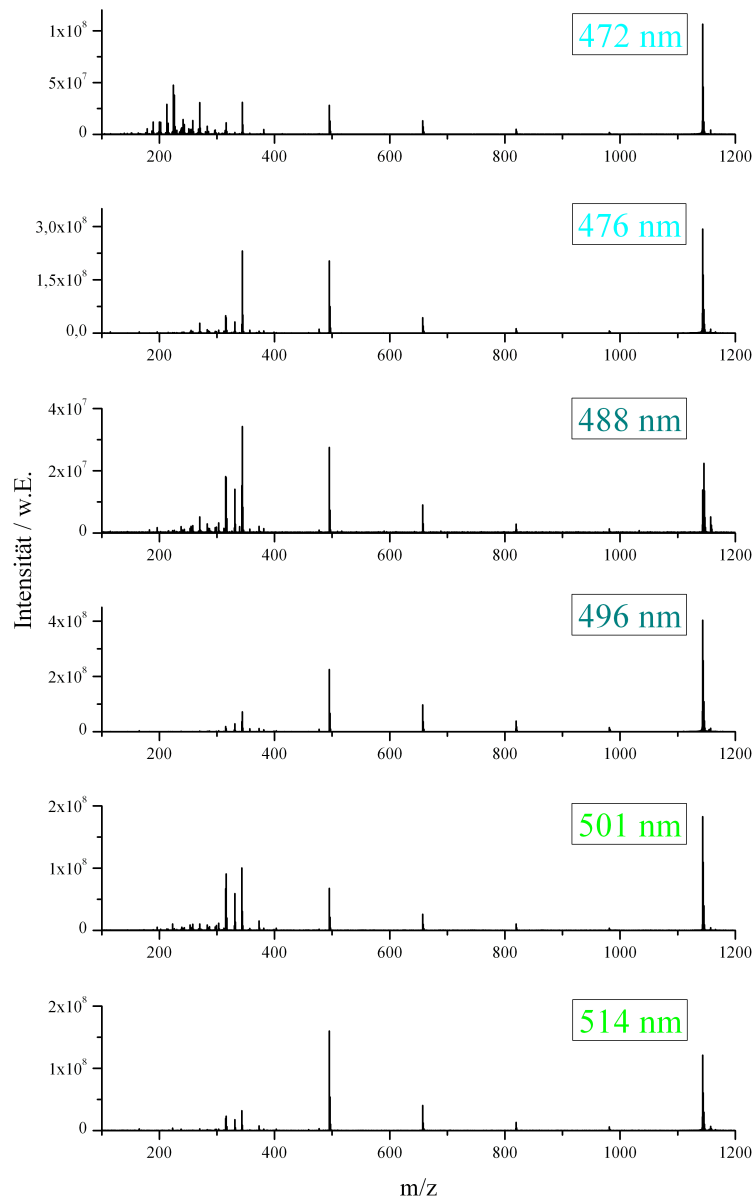


Abbildung A.5: VisPD-Spektren von $[\text{Maltopentaose-Rhodamin110}+\text{H}]^+$ bei unterschiedlichen Wellenlängen bei einer Laserleistung von 0,2 W.

Anhang B

B.1 Tabellenanhang

Tabelle B.1: Übersicht: Fragmente der Spezies $[2\text{LNFPI}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ und $[2\text{LNFPII}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$.

m/z	$[2\text{LNFPI}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$	$[2\text{LNFPII}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$
873,3		
800,3	$[2\text{LNFPI}+\text{H}+\text{K} - \text{Fuc}]^{2+}$	$[2\text{LNFPII}+\text{H}+\text{K} - \text{Fuc}]^{2+}$
772,2	$^{2,4}\text{A}_5 (\text{K}^+)$	$^{2,4}\text{A}_4 (\text{K}^+)$
730,2	$\text{C}_4 (\text{K}^+)$	-
727,2	$[2\text{LNFPI}+\text{H}+\text{K} - 2\text{Fuc}]^{2+}$	$[2\text{LNFPII}+\text{H}+\text{K} - 2\text{Fuc}]^{2+}$
692,2	$\text{C}_4 (\text{H}^+)$	$\text{C}_4 (\text{H}^+)$
662,2	$(\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{NO}_{19})^+ (\text{H}^+)$	$(\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{NO}_{19})^+ (\text{H}^+)$
626,2	$^{2,4}\text{A}_5/\text{Y}_4 (\text{K}^+)$	$^{2,4}\text{A}_4/\text{Y}_{3\beta} (\text{K}^+)$
610,2	-	$^{2,4}\text{A}_4/\text{Y}_{3\alpha} (\text{K}^+)$
550,1	$\text{B}_3 (\text{K}^+)$	$\text{B}_2 (\text{K}^+)$
516,1	-	$(\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{NO}_{15})^+ (\text{H}^+)$
512,2	$\text{B}_3 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2 (\text{H}^+)$
464,1	$^{2,4}\text{A}_5/\text{Y}_3 (\text{K}^+)$	$^{2,4}\text{A}_4/\text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{K}^+)$
446,6	$[\text{LNFPI}+\text{H}+\text{K}]^+$	$[\text{LNFPII}+\text{H}+\text{K}]^+$
404,1	$\text{B}_3/\text{Y}_4 (\text{K}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta} (\text{K}^+)$
373,6	$[\text{LNFPI}+\text{H}+\text{K} - \text{Fuc}]^{2+}$	$[\text{LNFPII}+\text{H}+\text{K} - \text{Fuc}]^{2+}$
366,1	$\text{B}_3/\text{Y}_4 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta} (\text{H}^+)$
344,1	-	$(\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{KNO}_7)^+ (\text{K}^+)$
302,0	$^{2,4}\text{A}_4/\text{Y}_3 (\text{K}^+)$	$^{2,4}\text{A}_3/\text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{K}^+)$
284,0	-	$^{2,4}\text{A}_3/\text{Y}_{3\alpha/3\beta 3} - \text{H}_2\text{O} (\text{K}^+)$
266,0	-	$^{2,4}\text{A}_3/\text{Z}_{3\alpha/3\beta 3} (\text{K}^+)$
242,0	$\text{B}_3/\text{Y}_3 (\text{K}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{K}^+)$
204,1	$\text{B}_3/\text{Y}_3 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_3 (\text{H}^+)$

Tabelle B.2: Übersicht: Signale der Adduktionenspezies von Maltopentaose (MP) und LS-Tetrasaccharid c (LSTc).

Signal bei m/z	MP	LSTc
$[M+H+K]^{2+}$	434,1	519,1
$[2M+H+K - \text{Fuc}]^{2+}$	-	872,8
$[M+\text{NH}_4]^+$	846,3	-
$[M+H]^+$	829,3	999,4
$[2M+H+K]^{2+}$	848,3	1018,3
$[M+\text{Na}]^+$	851,3	1021,3
$[M+K]^+$	867,3	1037,3
$[3M+H+K]^{2+}$	1262,9	-

Tabelle B.3: Übersicht: Fragmente der Spezies $[2\text{LNFPI}+\text{Sr}]^{2+}$ und $[2\text{LNFPII}+\text{Sr}]^{2+}$.

m/z	$[2\text{LNFPI}+\text{Sr}]^{2+}$	$[2\text{LNFPII}+\text{Sr}]^{2+}$
898,3		
824,2	$[2\text{LNFPI}+\text{Sr} - \text{Fuc}]^{2+}$	$[2\text{LNFPII}+\text{Sr} - \text{Fuc}]^{2+}$
820,2	$[^{2,4}\text{A}_5+\text{Sr} - \text{H}]^+$	$[^{2,4}\text{A}_4+\text{Sr} - \text{H}]^+$
751,2	$[2\text{LNFPI}+\text{Sr} - 2\text{Fuc}]^{2+}$	$[2\text{LNFPI}+\text{Sr} - 2\text{Fuc}]^{2+}$
710,1	?	-
674,1	$[^{2,4}\text{A}_5/\text{Y}_4+\text{Sr} - \text{H}]^+$	$[^{2,4}\text{A}_4/\text{Y}_{3\beta}+\text{Sr} - \text{H}]^+$
658,1	-	$[^{2,4}\text{A}_4/\text{Y}_{3\alpha}+\text{Sr} - \text{H}]^+$
598,1	$[\text{B}_3+\text{Sr} - \text{H}]^+$	$[\text{B}_2+\text{Sr} - \text{H}]^+$
564,1	710 - Fuc	-
522,1	564,1 - $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$	-
512,2	$\text{B}_3 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2 (\text{H}^+)$
478,0	-	$[^{2,4}\text{A}_3/\text{Z}_{3\alpha/3\beta}+\text{Sr} - \text{H}]^+$
470,6	$[\text{LNFPI}+\text{Sr}]^{2+}$	$[\text{LNFPII}+\text{Sr}]^{2+}$
452,0	$[\text{B}_3 / \text{Y}_4+\text{Sr} - \text{H}]^+$	$[\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta}+\text{Sr} - \text{H}]^+$
397,6	$\text{Y}_4(\text{Sr}^{2+})$	$\text{Y}_{3\beta}(\text{Sr}^{2+})$
366,1	$\text{B}_3 / \text{Y}_4 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta} (\text{H}^+)$
337,6	$^{2,4}\text{A}_5/\text{Y}_4 (\text{Sr}^{2+})$	-
309,0	$(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_9)^+(\text{H}^+)$	$(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_9)^+(\text{H}^+)$
290,0	$[\text{B}_3/\text{Y}_3+\text{Sr} - \text{H}]^+$	$[\text{B}_2/\text{Y}_{3\alpha/3\beta}+\text{Sr} - \text{H}]^+$
272,0	$(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{Sr})^+(\text{Sr}^+)$	$(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{Sr})^+(\text{Sr}^+)$
204,1	$\text{B}_3/\text{Y}_3 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{H}^+)$

Tabelle B.4: Übersicht: Fragmente der Spezies $[2\text{LNFPI}+\text{Ba}]^{2+}$ und $[2\text{LNFPII}+\text{Ba}]^{2+}$.

m/z	$[2\text{LNFPI}+\text{Ba}]^{2+}$	$[2\text{LNFPII}+\text{Ba}]^{2+}$
922,3		
870,2	$[\text{}^{2,4}\text{A}_5+\text{Ba} -\text{H}]^+$	$[\text{}^{2,4}\text{A}_4+\text{Ba} -\text{H}]^+$
849,2	$[2\text{LNFPI}+\text{Ba} - \text{Fuc}]^{2+}$	$[2\text{LNFPII}+\text{Ba} - \text{Fuc}]^{2+}$
776,2	$[2\text{LNFPI}+\text{Ba} - 2\text{Fuc}]^{2+}$	$[2\text{LNFPI}+\text{Ba} - 2\text{Fuc}]^{2+}$
724,1	$[\text{}^{2,4}\text{A}_5/\text{Y}_4+\text{Ba} -\text{H}]^+$	$[\text{}^{2,4}\text{A}_4/\text{Y}_{3\beta}+\text{Ba} -\text{H}]^+$
708,1	-	$[\text{}^{2,4}\text{A}_4/\text{Y}_{3\alpha}+\text{Ba} -\text{H}]^+$
648,1	$[\text{B}_3+\text{Ba} -\text{H}]^+$	$[\text{B}_2+\text{Ba} -\text{H}]^+$
512,2	$\text{B}_3 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2 (\text{H}^+)$
502,0	$[\text{B}_3 / \text{Y}_4+\text{Ba} -\text{H}]^+$	$[\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta}+\text{Ba} -\text{H}]^+$
495,6	$[\text{LNFPI}+\text{Ba}]^{2+}$	$[\text{LNFPII}+\text{Ba}]^{2+}$
468,0	-	$\text{}^{2,4}\text{A}_4 (\text{Ba}^{2+})$
422,6	$\text{Y}_4(\text{Ba}^{2+})$	$\text{Y}_{3\beta}(\text{Ba}^{2+})$
366,1	$\text{B}_3 / \text{Y}_4 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta} (\text{H}^+)$
359,0	$(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{BaO}_7)^+(\text{Ba}^+)$	$(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{BaO}_7)^+(\text{Ba}^+)$
256,9	$(\text{C}_4\text{H}_7\text{BaO}_4)^+(\text{Ba}^+)$	$(\text{C}_4\text{H}_7\text{BaO}_4)^+(\text{Ba}^+)$
204,1	$\text{B}_3/\text{Y}_3 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{H}^+)$

Tabelle B.5: Übersicht: Fragmente der Spezies $[\text{LNFPI-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$ und $[\text{LNFPII-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$. Fragmente die bei der VisPD gebildet werden sind schwarz, CID-Fragmente sind blau und Fragmente, die mit beiden Anregungsmethoden gebildet werden, sind grün dargestellt.

m/z	$[\text{LNFPI-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$	$[\text{LNFPII-Rh110}+\text{H}+\text{Li}]^{2+}$
595,7		
1168,4	$[\text{LNFPI-Rh110}+\text{H}]^+$	$[\text{LNFPII-Rh110}+\text{H}]^+$
696,3	$[\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NLiO}_{20}]^+$	$[\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NLiO}_{20}]^+$
663,2	$\text{Y}_2 (\text{Li}^+)$	$\text{Y}_2 (\text{Li}^+)$
657,2	$\text{Y}_2 (\text{H}^+)$	$\text{Y}_2 (\text{H}^+)$
534,2	$\text{B}_4/ \text{Y}_4 (\text{Li}^+)$	$\text{B}_3/ \text{Y}_{3\beta} (\text{Li}^+)$
518,2	$\text{B}_3 (\text{Li}^+)$	$\text{B}_2 (\text{Li}^+)$
514,7	$[\text{Y}_4+\text{Li}+\text{H}]^{2+}$	$[\text{Y}_{3\beta} +\text{Li}+\text{H}]^{2+}$
495,2	$\text{Y}_1 (\text{H}^+)$	$\text{Y}_1 (\text{H}^+)$
433,6	$[\text{Y}_3+\text{Li}+\text{H}]^{2+}$	$[\text{Y}_{3\alpha/3\beta} +\text{Li}+\text{H}]^{2+}$
390,2	$\text{C}_4/ \text{Y}_3 (\text{Li}^+)$	$\text{C}_3/\text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{Li}^+)$
372,1	$\text{B}_3/ \text{Y}_4 (\text{Li}^+)$	$\text{B}_2/ \text{Y}_{3\beta} (\text{Li}^+)$
356,1	-	$\text{C}_3/ \text{Z}_{3\alpha/3\beta} (\text{Li}^+)$
344,1	$[\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NO}_{10}]^+$	$[\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NO}_{10}]^+$

Tabelle B.6: Übersicht: Fragmente der Spezies $[\text{LNFPI-Rh110+H+Na}]^{2+}$ und $[\text{LNFPII-Rh110+H+Na}]^{2+}$. Fragmente, die bei der VisPD gebildet werden sind schwarz und Fragmente die bei der CID und der VisPD gebildet werden sind grün dargestellt.

m/z	$[\text{LNFPI-Rh110+H+Na}]^{2+}$	$[\text{LNFPII-Rh110+H+Na}]^{2+}$
595,7		
1168,4	$[\text{LNFPII-Rh110+H}]^+$	$[\text{LNFPII-Rh110+H}]^+$
712,2	$[\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NNaO}_{20}]^+$	$[\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NNaO}_{20}]^+$
657,2	$\text{Y}_2 (\text{H}^+)$	$\text{Y}_2 (\text{H}^+)$
550,2	$\text{B}_4/ \text{Y}_4 (\text{Na}^+)$	$\text{B}_3/ \text{Y}_{3\beta} (\text{Na}^+)$
534,2	$\text{B}_3 (\text{Na}^+)$	$\text{B}_2 (\text{Na}^+)$
522,7	$[\text{Y}_4+\text{H+Na}]^{2+}$	$[\text{Y}_{3\beta} +\text{H+Na}]^{2+}$
495,2	$\text{Y}_1 (\text{H}^+)$	$\text{Y}_1 (\text{H}^+)$
477,2	$\text{Z}_1 (\text{H}^+)$	$\text{Z}_1 (\text{H}^+)$
406,1	$\text{C}_4/ \text{Y}_4 (\text{Na}^+)$	$\text{C}_3/ \text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{Na}^+)$
388,1	$\text{B}_3/ \text{Y}_4 (\text{Na}^+)$	$\text{B}_2/ \text{Y}_{3\beta} (\text{Na}^+)$
371,1	-	$\text{C}_3/ \text{Z}_{3\alpha/3\beta} (\text{Na}^+)$
344,1	$[\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NO}_{10}]^+$	$[\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NO}_{10}]^+$
331,1	$\text{Rh110} (\text{H}^+)$	$\text{Rh110} (\text{H}^+)$

Tabelle B.7: Übersicht: Fragmente der Spezies $[\text{LNFP I-Rh110+2Na}]^{2+}$ und $[\text{LNFP II-Rh110+2Na}]^{2+}$, die bei der VisPD und CID auftreten.

Fragmente 606,7	$[\text{LNFP I-Rh110+2Na}]^{2+}$ /m/z	$[\text{LNFP II-Rh110+2Na}]^{2+}$ /m/z
1190,4	$[\text{LNFP II-Rh110+Na}]^+$	$[\text{LNFP II-Rh110+Na}]^+$
1044,4	$\text{Y}_4 (\text{Na}^+)$	$\text{Y}_{3\beta} (\text{Na}^+)$
700,2	$^{0,1}\text{A}_5/ \text{Y}_4 (\text{Na}^+)$	$^{0,1}\text{A}_5/ \text{Y}_{3\beta} (\text{Na}^+)$
679,2	$\text{Y}_2 (\text{Na}^+)$	$\text{Y}_2 (\text{Na}^+)$
550,2	$\text{B}_4/ \text{Y}_4 (\text{Na}^+)$	$\text{B}_3/ \text{Y}_{3\beta} (\text{Na}^+)$
533,7	$[\text{Y}_4+2\text{Na}]^{2+}$	$[\text{Y}_{3\beta} +2\text{Na}]^{2+}$
406,1	$\text{C}_4/ \text{Y}_3 (\text{Na}^+)$	$\text{C}_3/ \text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{Na}^+)$
388,1	$\text{B}_3/ \text{Y}_4 (\text{Na}^+)$	$\text{B}_2/ \text{Y}_{3\beta} (\text{Na}^+)$
367,1	$^{0,1}\text{X}_0$	$^{0,1}\text{X}_0$
335,1	$[\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{NNaO}_3]^+$	$[\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{NNaO}_3]^+$

Tabelle B.8: Chromophore mit geringer Fragmentierung bei der Vis-Einstrahlung.

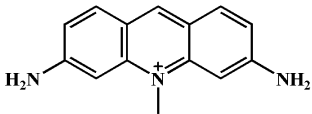
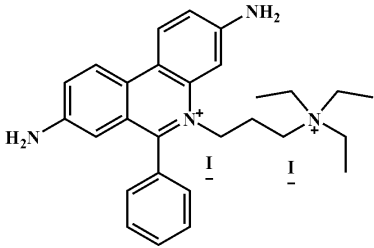
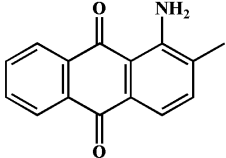
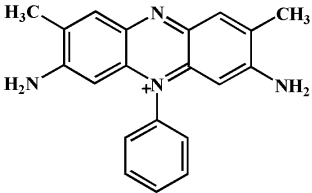
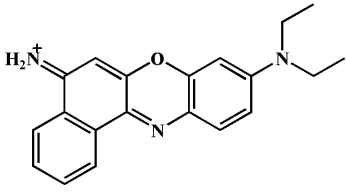
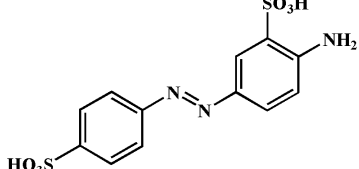
	Acriflavin
	Propidiumiodid (PI)
	1-Amino-2-methylantraquinone
	Safranine T
	Nilblue
	Acid Yellow 9

Tabelle B.9: Übersicht: Fragmente der Spezies $[\text{LNFP I-Rh110+H+K}]^{2+}$ und $[\text{LNFP II-Rh110+H+K}]^{2+}$. Fragmente die bei der VisPD gebildet werden sind schwarz, CID-Fragmente sind blau und Fragmente die mit beiden Anregungsmethoden gebildet werden sind grün dargestellt.

Fragmente 603,7	$[\text{LNFP I-Rh110+H+K}]^{2+}$ /m/z	$[\text{LNFP II-Rh110+H+K}]^{2+}$ /m/z
1168,4	$[\text{LNFP II-Rh110+H}]^+$	$[\text{LNFP II-Rh110+H}]^+$
1022,3	$\text{Y}_4 (\text{H}^+)$	-
862,3	-	$^{0,1}\text{A}_4 (\text{K}^+)$
730,2	$\text{C}_4 (\text{K}^+)$	$\text{C}_3 (\text{K}^+)$
728,2	$[\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NKO}_{20}]^+$	$[\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NKO}_{20}]^+$
657,2	$\text{Y}_2 (\text{H}^+)$	$\text{Y}_2 (\text{H}^+)$
495,2	$\text{Y}_1 (\text{H}^+)$	$\text{Y}_1 (\text{H}^+)$
431,6	-	$[\text{Y}_{3\alpha/3\beta}+\text{H+K}]^{2+}$
404,1	$\text{B}_3/\text{Y}_4 (\text{K}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta} (\text{K}^+)$
388,1	-	$\text{C}_3/\text{Z}_{3\alpha/3\beta} (\text{K}^+)$
366	$\text{B}_3/\text{Y}_4 (\text{H}^+)$	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\beta} (\text{H}^+)$
344,1	$[\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NO}_{10}]^+$	$[\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NO}_{10}]^+$
331,1	$\text{Rh110} (\text{H}^+)$	$\text{Rh110} (\text{H}^+)$
315,1	$[\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2]^+$	$[\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2]^+$
204,1	-	$\text{B}_2/\text{Y}_{3\alpha/3\beta} (\text{H}^+)$

B.2 Spektrenanhang

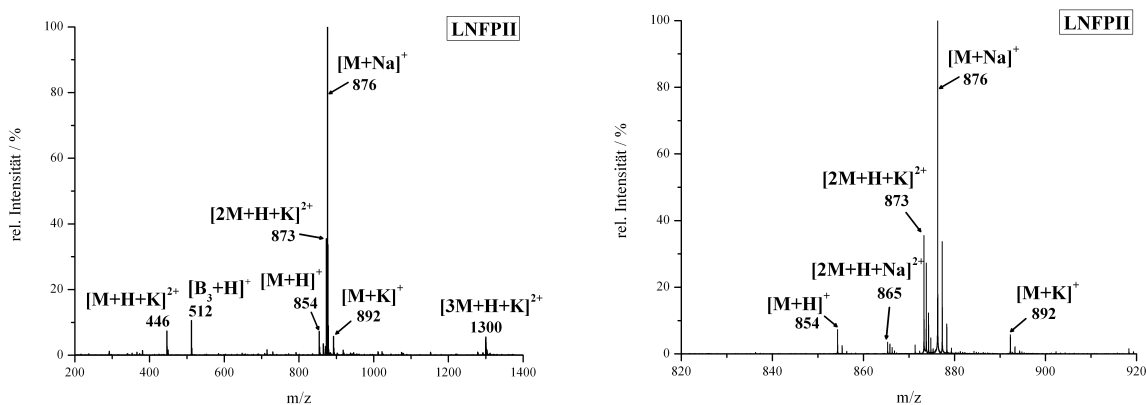


Abbildung B.1: Übersichtsspektrum von $10\mu\text{M}$ LNFPII unter Verwendung von $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) als ESI-Lösungsmittel.

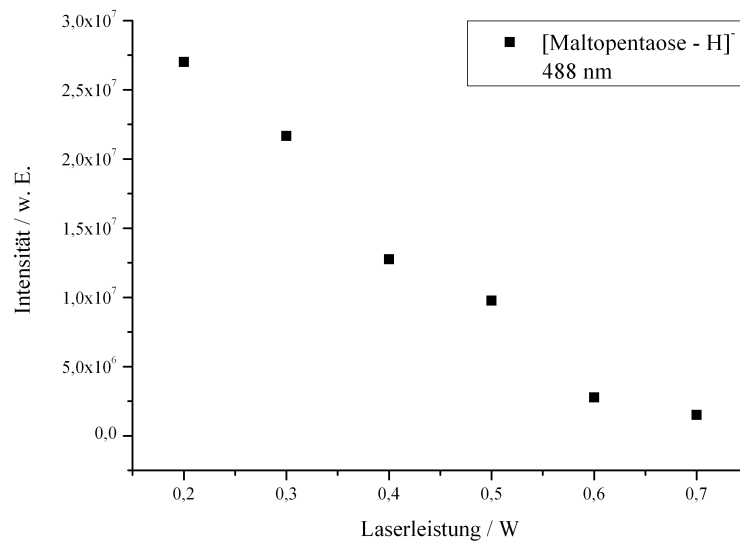


Abbildung B.2: Auftragung der Signalintensität von $[\text{Maltopentaose} - \text{H}]^-$ gegen die Laserleistung bei 488 nm .

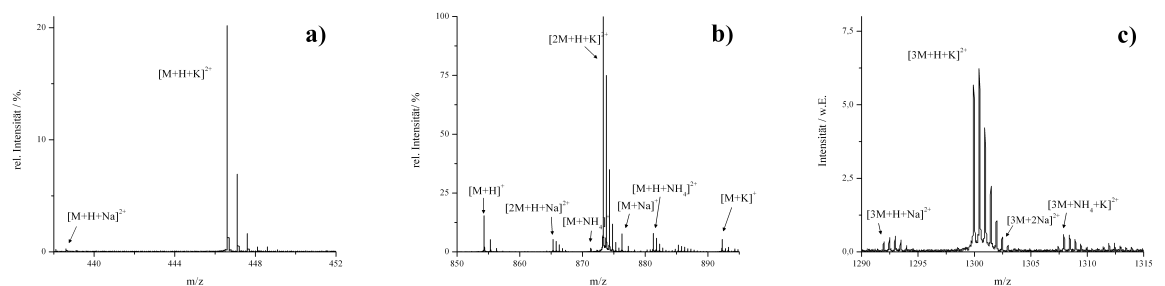


Abbildung B.5: Ausschnitte eines Übersichtsspektrums von $10 \mu\text{M}$ LNFPII in Wasser: a) zweifach geladene Pentasaccharid-Monomere, b) einfach geladene Monomere und zweifach geladene Dimere, c) zweifach geladene Trimere.

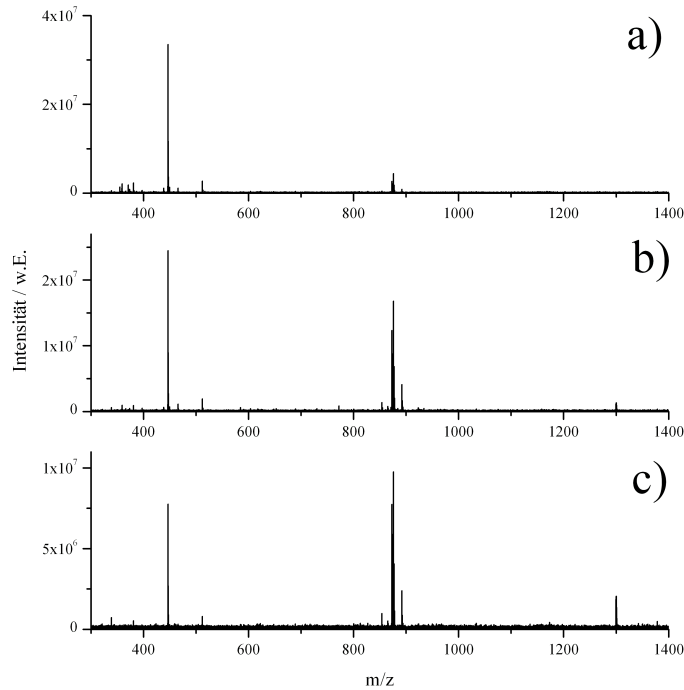


Abbildung B.3: Übersichtsspektren von LNFPII bei unterschiedlichem m/z -Fokus. Optimierung der Signalintensitäten durch Veränderung zeitlicher Parameter auf die m/z -Bereiche von ca. a) m/z 400 bis m/z 500, b) m/z 820 bis m/z 920, c) m/z 1250 bis m/z 1350.

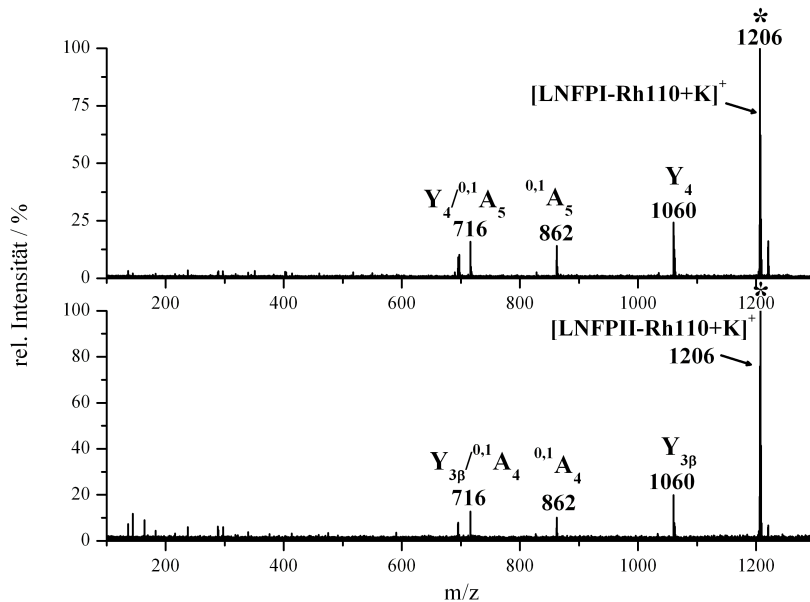


Abbildung B.13: CID-Spektren von (oben) $[LNFPI-Rh110+K]^+$ ($m/z = 1206,3$), (unten) $[LNFPII-Rh110+K]^+$ ($m/z = 1206,3$).

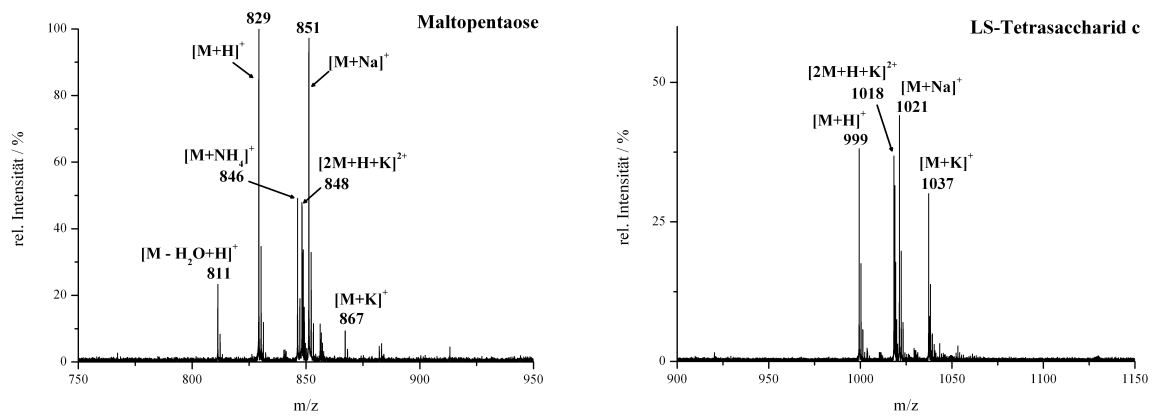


Abbildung B.4: Ausschnitt der Übersichtsspektren von (links) Maltopentaose und (rechts) LS-Tetrasaccharid c.

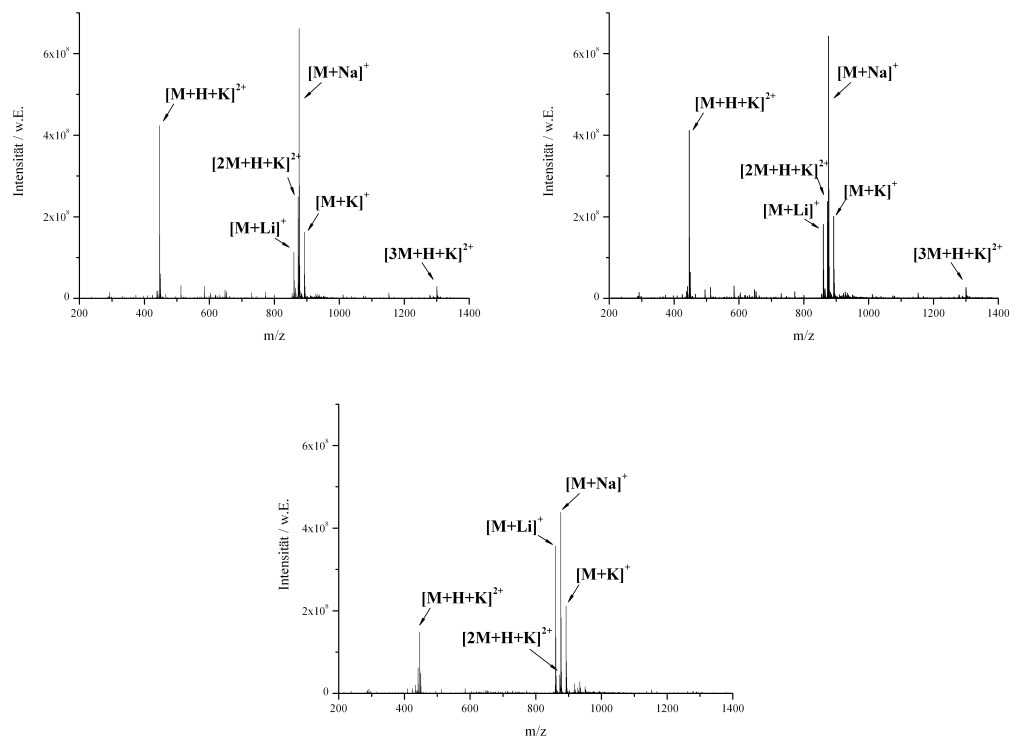


Abbildung B.6: Intensität der Adduktionen bei Zugabe von Li^+ , Na^+ und K^+ ($5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ und $50\mu\text{M}$). Die Konzentration von LNFP II beträgt konstant $10\mu\text{M}$.

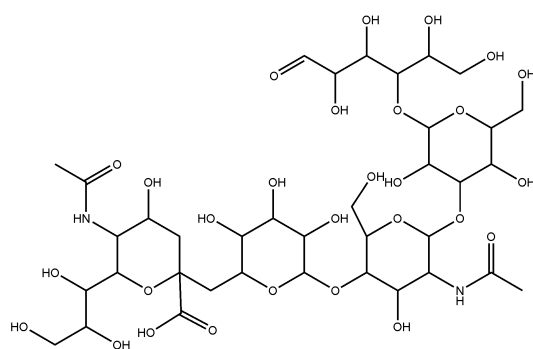


Abbildung B.7: LS-Tetrasaccharid c

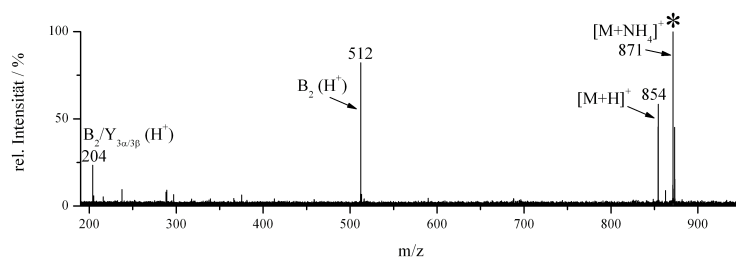


Abbildung B.8: CID-Spektrum von $[LNFPII+NH_4]^+$ ($m = 871,3 \text{ m/z}$).

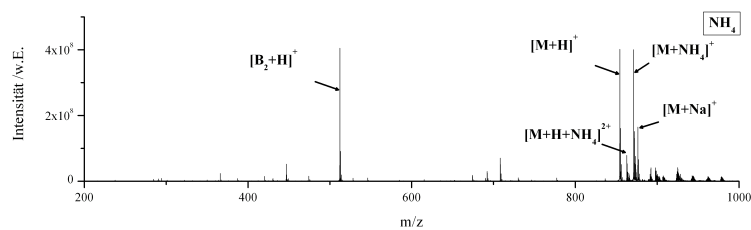


Abbildung B.9: Übersichtsspektren mit Zugabe von Ammoniumionen ($100 \mu\text{M}$) zu $10 \mu\text{M}$ LNFPII in H_2O .

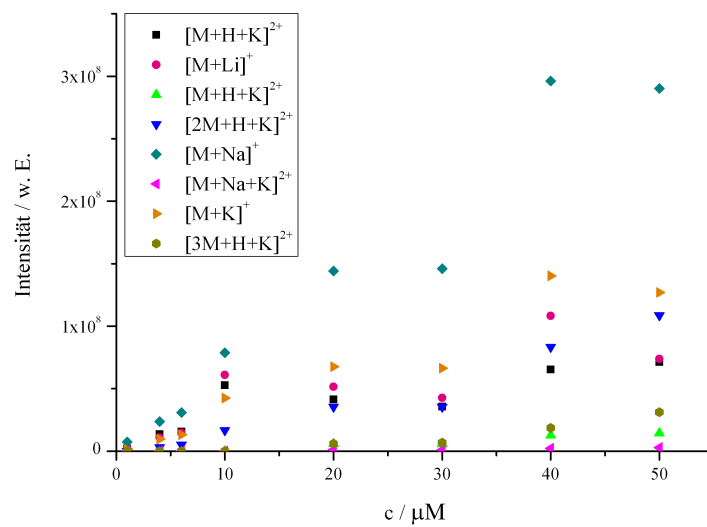


Abbildung B.10: Intensität der Adduktionen bei verschiedenen LNFP II-Konzentrationen. Die Alkalikonzentration von Li^+ , Na^+ und K^+ beträgt $100 \mu\text{M}$.

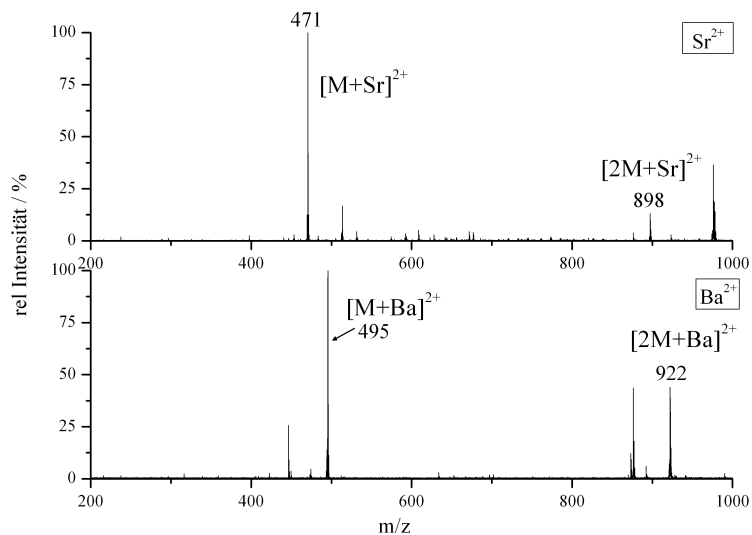


Abbildung B.11: Oben) Spektrum von $10 \mu\text{M}$ LNFP II mit Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Sr^{2+} . Unten) Spektrum von $10 \mu\text{M}$ LNFP II mit Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Ba^{2+} .

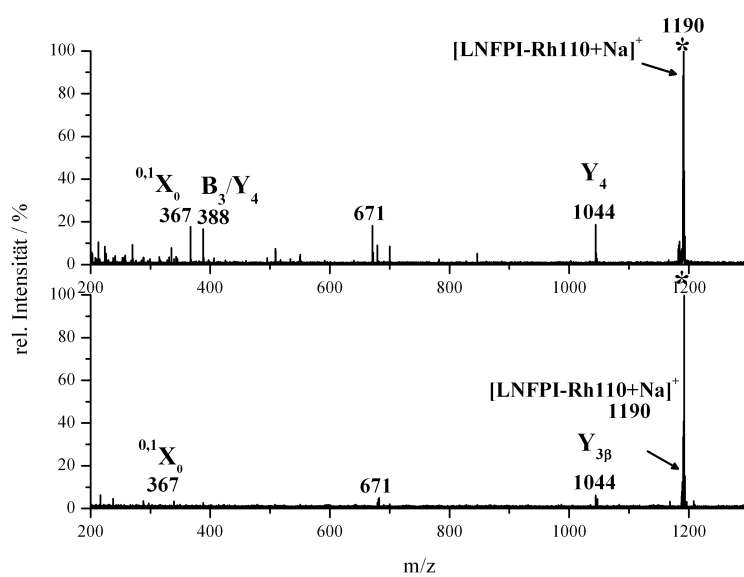


Abbildung B.12: CID-Spektren von (oben) $[LNFPI-Rh110+Na]^+$ ($m/z = 1190,3$), (un-
ten) $[LNFPI-Rh110+Na]^+$ ($m/z = 1190,3$).

Literaturverzeichnis

- [1] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3(2), 97.
- [2] R. Dwek, *Chemical reviews* **1996**, 96(2), 683.
- [3] H. Lis, S. N. Sharon, *European Journal of Biochemistry* **2005**, 218(1), 1.
- [4] A. Kobata, *European Journal of Biochemistry* **2005**, 209(2), 483.
- [5] K. Hicks, *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **1988**, 46, 17.
- [6] E. Von Dungern, L. Hirschfeld, *Molecular and General Genetics MGG* **1911**, 5(1), 196.
- [7] C. Kunz, S. Rudloff, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **1996**, 35(1), 22.
- [8] S. Thurl, J. Henker, M. Siegel, K. Tovar, G. Sawatzki, *Glycoconjugate journal* **1997**, 14(7), 795.
- [9] L. Sleno, D. Volmer, *Journal of mass spectrometry* **2004**, 39(10), 1091.
- [10] R. Seipert, E. Dodds, B. Clowers, S. Beecroft, J. German, C. Lebrilla, *Analytical chemistry* **2008**, 80(10), 3684.
- [11] J. Zhang, K. Schuboth, B. Li, S. Russell, C. Lebrilla, *Analytical chemistry* **2005**, 77(1), 208.
- [12] Y. Xie, C. Lebrilla, *Analytical chemistry* **2003**, 75(7), 1590.
- [13] M. Cancilla, S. Penn, J. Carroll, C. Lebrilla, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118(28), 6736.
- [14] K. Lancaster, H. An, B. Li, C. Lebrilla, *Analytical chemistry* **2006**, 78(14), 4990.

- [15] Q. Enjalbert, A. Racaud, J. Lemoine, S. Redon, M. M. Ayhan, C. Andraud, S. Chambert, Y. Bretonniere, C. Loison, R. Antoine, et al., *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, 116(2), 841.
- [16] J. Wilson, J. Brodbelt, *Analytical chemistry* **2008**, 80(13), 5186.
- [17] A. Imberty, S. Pérez, et al., *Chemical Reviews-Columbus* **2000**, 100(12), 4567.
- [18] D. Harvey, *Journal of Chromatography B* **2011**, 879(17), 1196.
- [19] G. P. Moss, P. A. S. Smith, D. Tavernier, *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, No. 8-9, pp., 1307.
- [20] P. György, R. Norris, C. Rose, *Archives of biochemistry and biophysics* **1954**, 48(1), 193.
- [21] L. Bode, *Nutrition reviews* **2009**, 67, 183.
- [22] C. Kunz, S. Rudloff, *Acta Paediatrica* **2008**, 82(12), 903.
- [23] D. Zopf, S. Roth, *The Lancet* **1996**, 347(9007), 1017.
- [24] L. Bode, *Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden auf Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen im Immunsystem*, Dissertation, Universitätsbibliothek Giessen, **2003**.
- [25] N. Sharon, H. Lis, *Scientific American* **1993**, 268(1), 82.
- [26] B. Finke, B. Stahl, A. Pfenninger, M. Karas, H. Daniel, G. Sawatzki, *Analytical chemistry* **1999**, 71(17), 3755.
- [27] B. Stahl, S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup, G. Sawatzki, *Analytical biochemistry* **1994**, 223(2), 218.
- [28] B. Finke, M. Mank, H. Daniel, B. Stahl, *Analytical biochemistry* **2000**, 284(2), 256.
- [29] P. Agrawal, *Phytochemistry* **1992**, 31(10), 3307.
- [30] D. Harvey, et al., *Mass Spectrometry Reviews* **1999**, 18(6), 349.
- [31] J. Zaia, *Mass spectrometry reviews* **2004**, 23(3), 161.

- [32] J. Zaia, *Chemistry & biology* **2008**, 15(9), 881.
- [33] H. Egge, J. Peter-Katalinić, *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, 6(3), 331.
- [34] M. Comisarow, A. Marshall, *Chemical physics letters* **1974**, 25(2), 282.
- [35] F. Penning, *physica* **1936**, 3(9), 873.
- [36] E. Lawrence, M. Livingston, *Physical Review* **1932**, 40(1), 19.
- [37] F. C., *Untersuchungen zum massenspektrometrischen Fragmentierungsverhalten von Steroiden*, Dissertation, Universität zu Kiel, **2011**.
- [38] R. Zubarev, N. Kelleher, F. McLafferty, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120(13), 3265.
- [39] K. Henry, E. Williams, B. Wang, F. McLafferty, J. Shabanowitz, D. Hunt, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, 86(23), 9075.
- [40] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, C. Whitehouse, *Science* **1989**, 246(4926), 64.
- [41] A. Burlingame, R. Boyd, S. Gaskell, et al., *Analytical chemistry* **1994**, 66(12), 634R.
- [42] V. Reinhold, B. Reinhold, C. Costello, *Analytical chemistry* **1995**, 67(11), 1772.
- [43] F. Lamari, R. Kuhn, N. Karamanos, *Journal of Chromatography B* **2003**, 793(1), 15.
- [44] M. Wilm, M. Mann, *Analytical chemistry* **1996**, 68(1), 1.
- [45] U. Bahr, A. Pfenninger, M. Karas, B. Stahl, *Analytical chemistry* **1997**, 69(22), 4530.
- [46] P. Kebarle, L. Tang, *Analytical chemistry* **1993**, 65(22), 972.
- [47] K. Koshy, J. Boggs, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271(7), 3496.
- [48] G. Siuzdak, Y. Ichikawa, T. Caulfield, B. Munoz, C. Wong, K. Nicolaou, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115(7), 2877.
- [49] D. Harvey, *Journal of mass spectrometry* **2000**, 35(10), 1178.

- [50] K. Duffin, J. Welply, E. Huang, J. Henion, *Analytical chemistry* **1992**, 64(13), 1440.
- [51] M. Cancilla, A. Wong, L. Voss, C. Lebrilla, *Analytical chemistry* **1999**, 71(15), 3206.
- [52] A. Fura, J. Leary, *Analytical chemistry* **1993**, 65(20), 2805.
- [53] E. Sible, S. Brimmer, J. Leary, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, 8(1), 32.
- [54] D. Levin, P. Vouros, R. Miller, E. Nazarov, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18(3), 502.
- [55] D. Harvey, R. Bateman, M. Green, *Journal of mass spectrometry* **1997**, 32(2), 167.
- [56] R. Orlando, C. Allen Bush, C. Fenselau, *Biological Mass Spectrometry* **1990**, 19(12), 747.
- [57] J. Adamson, K. Hakansson, *Anal. Chem* **2007**, 79(7), 2901.
- [58] J. Wolff, I. Amster, L. Chi, R. Linhardt, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18(2), 234.
- [59] J. Hogan, S. Pitteri, P. Chrisman, S. McLuckey, *Journal of proteome research* **2005**, 4(2), 628.
- [60] B. Ko, J. Brodbelt, *Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 46(4), 359.
- [61] A. Devakumar, M. Thompson, J. Reilly, *Rapid communications in mass spectrometry* **2005**, 19(16), 2313.
- [62] A. Devakumar, D. O'Dell, J. Walker, J. Reilly, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, 19(1), 14.
- [63] B. Domon, C. Costello, *Glycoconjugate Journal* **1988**, 5(4), 397.
- [64] J. Carroll, D. Willard, C. Lebrilla, *Analytica chimica acta* **1995**, 307(2-3), 431.
- [65] M. Fentabil, R. Daneshfar, E. Kitova, J. Klassen, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, 22(12), 1.

- [66] V. Kováčik, J. Hirsch, P. Kováč, W. Heerma, J. Thomas-Oates, J. Haverkamp, *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, 30(7), 949.
- [67] L. Brüll, V. Kováčik, J. Thomas-Oates, W. Heerma, J. Haverkamp, *Rapid communications in mass spectrometry* **1998**, 12(20), 1520.
- [68] B. Ernst, D. Müller, W. Richter, *International journal of mass spectrometry and ion processes* **1997**, 160(1), 283.
- [69] Y. Mechref, A. Baker, M. Novotny, *Carbohydrate research* **1998**, 313(3-4), 145.
- [70] S. Penn, M. Cancilla, C. Lebrilla, *Analytical chemistry* **1996**, 68(14), 2331.
- [71] J. Wolff, T. Laremore, A. Busch, R. Linhardt, I. Amster, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, 19(6), 790.
- [72] K. Fukui, Y. Takada, T. Sumiyoshi, T. Imai, K. Takahashi, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110(32), 16111.
- [73] D. Ashline, S. Singh, A. Hanneman, V. Reinhold, *Analytical chemistry* **2005**, 77(19), 6250.
- [74] A. Dell, *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **1987**, 45, 19.
- [75] L. Ngoka, C. Lebrilla, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, 4(3), 210.
- [76] J. Carroll, L. Ngoka, C. Beggs, C. Lebrilla, *Analytical chemistry* **1993**, 65(11), 1582.
- [77] L. Ngoka, J. Gal, C. Lebrilla, *Analytical chemistry* **1994**, 66(5), 692.
- [78] A. Dell, H. Morris, H. Egge, H. von Nicolai, G. Strecker, *Carbohydrate research* **1983**, 115, 41.
- [79] S. Carr, V. Reinhold, B. Green, J. Hass, *Biological Mass Spectrometry* **1985**, 12(6), 288.
- [80] M. Asam, G. Glish, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, 8(9), 987.
- [81] G. Hofmeister, Z. Zhou, J. Leary, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113(16), 5964.

- [82] M. Mohr, K. Olaf Börnsen, H. Widmer, *Rapid communications in mass spectrometry* **1995**, 9(9), 809.
- [83] B. Spengler, J. Dolce, R. Cotter, *Analytical chemistry* **1990**, 62(17), 1731.
- [84] A. Imberty, S. Pérez, *Chemical Reviews* **2000**, 100(12), 4567.
- [85] R. Frański, B. Gierczyk, G. Schroeder, S. Beck, A. Springer, M. Linscheid, *Carbohydrate research* **2005**, 340(8), 1567.
- [86] L. Bouteau, E. Léon, J. Salpin, B. Amekraz, C. Moulin, J. Tortajada, et al., *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)* **2003**, 9(4), 377.
- [87] D. Harvey, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, 12(8), 926.
- [88] S. König, J. Leary, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, 9(11), 1125.
- [89] D. Harvey, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16(5), 631.
- [90] D. Harvey, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16(5), 622.
- [91] D. Harvey, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16(5), 647.
- [92] D. Garozzo, M. Giuffrida, G. Impallomeni, A. Ballistreri, G. Montaudo, *Analytical chemistry* **1990**, 62(3), 279.
- [93] J. Prome, H. Aurelle, D. Prome, A. Savagnac, *Organic mass spectrometry* **1987**, 22(1), 6.
- [94] A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, B. Stahl, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13(11), 1331.
- [95] A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, B. Stahl, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13(11), 1341.
- [96] A. Franz, C. Lebrilla, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13(4), 325.

- [97] D. Harvey, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, 11(10), 900.
- [98] A. Franz, T. Molinski, C. Lebrilla, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, 12(12), 1254.
- [99] D. Harvey, T. Mattu, M. Wormald, L. Royle, R. Dwek, P. Rudd, *Analytical chemistry* **2002**, 74(4), 734.
- [100] Y. Ma, I. Vedernikova, H. Van den Heuvel, M. Claeys, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, 11(2), 136.
- [101] R. Cody, R. Burnier, B. Freiser, *Analytical chemistry* **1982**, 54(1), 96.
- [102] J. J. Wilson, *Development of Photodissociation Methods for Biomolecule Analysis in a Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer*, Dissertation, The University of Texas Austin, **2008**.
- [103] A. Racaud, R. Antoine, L. Joly, N. Mesplet, P. Dugourd, J. Lemoine, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20(9), 1645.
- [104] A. Devakumar, Y. Mechref, P. Kang, M. Novotny, J. Reilly, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, 19(7), 1027.
- [105] S. M. Zucker, S. Lee, N. Webber, S. J. Valentine, J. P. Reilly, D. E. Clemmer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, 22(9), 1477.
- [106] S. Lee, S. J. Valentine, J. P. Reilly, D. E. Clemmer, *International journal of mass spectrometry* **2012**, 309, 161.
- [107] J. Wilson, G. Kirkovits, J. Sessler, J. Brodbelt, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, 19(2), 257.
- [108] Z. Guan, N. Kelleher, P. O'Connor, D. Aaserud, D. Little, F. McLafferty, *International journal of mass spectrometry and ion processes* **1996**, 157, 357.
- [109] D. Little, J. Speir, M. Senko, P. O'Connor, F. McLafferty, *Analytical chemistry* **1994**, 66(18), 2809.
- [110] L. Zhang, J. Reilly, *Analytical chemistry* **2009**, 81(18), 7829.

- [111] W. Cui, M. Thompson, J. Reilly, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16(8), 1384.
- [112] M. Thompson, W. Cui, J. Reilly, *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43(36), 4791.
- [113] J. Oh, J. Moon, M. Kim, *Rapid communications in mass spectrometry* **2004**, 18(22), 2706.
- [114] J. Oh, J. Moon, Y. Lee, S. Hyung, S. Lee, M. Kim, *Rapid communications in mass spectrometry* **2005**, 19(10), 1283.
- [115] J. Oh, J. Moon, M. Kim, *Journal of mass spectrometry* **2005**, 40(7), 899.
- [116] J. Brodbelt, J. Wilson, *Mass spectrometry reviews* **2009**, 28(3), 390.
- [117] M. Pikulski, A. Hargrove, S. Shabbir, E. Anslyn, J. Brodbelt, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18(12), 2094.
- [118] M. Pikulski, J. Wilson, A. Aguilar, J. Brodbelt, *Analytical chemistry* **2006**, 78(24), 8512.
- [119] K. Hakansson, H. Cooper, M. Emmett, C. Costello, A. Marshall, C. Nilsson, *Analytical chemistry* **2001**, 73(18), 4530.
- [120] R. Seipert, E. Dodds, C. Lebrilla, *Journal of proteome research* **2008**, 8(2), 493.
- [121] J. McClellan, C. Costello, P. B. O. r, , J. Zaia, *Analytical chemistry* **2002**, 74(15), 3760.
- [122] J. Wilson, J. Brodbelt, *Anal. Chem* **2007**, 79(20), 7883.
- [123] A. Racaud, R. Antoine, P. Dugourd, J. Lemoine, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, 21(12), 2077.
- [124] T. Ly, R. Julian, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48(39), 7130.
- [125] A. Devakumar, Y. Mechref, P. Kang, M. Novotny, J. Reilly, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21(8), 1452.
- [126] B. J. Ko, J. S. Brodbelt, *Analytical chemistry* **2011**, 83(21), 8192.

- [127] A. Racaud, A. Allouche, R. Antoine, J. Lemoine, P. Dugourd, *Journal of Molecular Structure: Theochem* **2010**, 960(1-3), 51.
- [128] E. Reimerdes, K. Rothkitt, *Fresenius' Journal of Analytical chemistry* **1984**, 318(3), 220.
- [129] D. Harvey, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, 11(10), 900.
- [130] I. Molnár-Perl, *Journal of Chromatography A* **2000**, 891(1), 1.
- [131] V. Zaikin, J. Halket, *A handbook of derivatives for mass spectrometry*, IM Publications, **2009**.
- [132] A. Ruiz-Matute, O. Hernandez-Hernandez, S. Rodriguez-Sanchez, M. Sanz, I. Martinez-Castro, *Journal of Chromatography B* **2011**, 879(17), 1226.
- [133] S. Hase, *Journal of Chromatography A* **1996**, 720(1), 173.
- [134] K. Anumula, *Analytical biochemistry* **2000**, 283(1), 17.
- [135] J. Waterval, H. Lingeman, A. Bult, W. Underberg, *Electrophoresis* **2000**, 21(18), 4029.
- [136] E. Lattová, S. Snovida, H. Perreault, O. Krokhin, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16(5), 683.
- [137] M. Breadmore, E. Hilder, A. Kazarian, *Fluorophores and Chromophores for the Separation of Carbohydrates by Capillary Electrophoresis*, Springer, **2011**.
- [138] K. Anumula, et al., *Analytical biochemistry* **2006**, 350(1), 1.
- [139] D. Westfall, R. Flores, G. Negrete, A. Martinez, L. Haro, *Analytical biochemistry* **1998**, 265(2), 232.
- [140] A. Loß, P. Bunsmann, A. Bohne, A. Loß, E. Schwarzer, E. Lang, C. Von der Lieth, *Nucleic acids research* **2002**, 30(1), 405.
- [141] A. F. Holleman, E. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, **1995**.
- [142] U. Bahr, A. Pfenninger, M. Karas, B. Stahl, *Analytical chemistry* **1997**, 69(22), 4530.

- [143] M. B. Renfrow, H. J. Cooper, M. Tomana, R. Kulhavy, Y. Hiki, K. Toma, M. R. Emmett, J. Mestecky, A. G. Marshall, J. Novak, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280(19), 19136.
- [144] C. Liou, J. Brodbelt, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1992**, 3(5), 543.
- [145] B. A. Cerda, C. Wesdemiotis, *International journal of mass spectrometry* **1999**, 189(2), 189.
- [146] R. Dunbar, *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 200(1), 571.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Bestandteile von Blutgruppenantigenen	2
2.1	Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) und Lacto-N-fucopentaose II (LNFP II).	6
2.2	Monosaccharide aus denen LNFP I und LNFP II aufgebaut werden	7
2.3	Kreisbewegung eines Kations in einem Magnetfeld B.	8
2.4	Bewegung eines Ions in einer ICR-Zelle	10
2.5	Schematische Anregung und Detektion der Ionen in der ICR-Zelle	11
2.6	Schematische Darstellung des ESI-Prozesses.	12
3.1	Nomenklatur der Oligosaccharidfragmente nach <i>Domon</i> und <i>Costello</i>	17
3.2	Nummerierung der Bindungen.	17
3.3	Bildung von B- und Y-Typ-Ionen bei protonierten Sacchariden.[63]	18
3.4	Fragmentierungswege von Alkali-Adduktionen: Verlust der Alkaliionen (A), glycosidische Bindungsbrüche (B) und Ringbrüche (C).[51]	20
3.5	Fragmentierung von (a) protonierten glycosidischen Bindungen und (b) Alkali-Adduktionen.[13]	21
3.6	Bildungsmechanismus von 0,2 A-Typ-Ionen.[13]	22
3.7	Bildungsmechanismus von 0,2 A-Typ-Ionen bei deprotonierten Sacchariden.	23
3.8	Glycosidische Bindungsbrüche bei deprotonierten Sacchariden.[63]	24
3.9	Umlagerung von Fucose bei Lacto-N-difucohexaose I.[96]	25
3.10	Laserwellenlängen, die zur Fragmentierung von Sacchariden verwendet wurden	27
3.11	Reduktive Aminierung eines Saccharids mit Rhodamin 110.	32
4.1	Schematischer Aufbau des FT-ICR-MS mit Combi Quelle und ApexQe.	35
4.2	Schematischer Aufbau der Spraykammer	36
5.1	Maltopentaose	41
5.2	VisPD-Spektrum von [Maltopentaose-Proflavin+H] ⁺ (m/z 1022,4).	42

5.3	Fragmente mit Saccharidanteil von (oben) $[\text{MP-PF}+\text{H}]^+$ und (unten) $[\text{MP-PI}]^{2+}$ bei der VisPD.	43
5.4	VisPD-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-Propidiumiodid}]^{2+}$ (m/z 613,3). . .	43
5.5	VisPD-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-2-Aminoazotoluol}+\text{H}]^+$ (m/z 1038,4). 44	
5.6	Fragmente mit Saccharidanteil von (oben) $[\text{MP-2AT}+\text{H}]^+$ und (unten) $[\text{MP-Rh110}+\text{H}]^+$ bei der CID und VisPD.	45
5.7	VisPD-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-Rhodamin 110}+\text{H}]^+$ (m/z 1143,4). . .	46
5.8	CID-Spektrum von $[\text{Maltopentaose}+\text{H}]^+$ (m/z 829,3).	47
5.9	CID-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-2-Aminoazotoluol}+\text{H}]^+$ (m/z 1038,4). . .	47
5.10	CID-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-Rhodamin 110}+\text{H}]^+$ (m/z 1143,4). . .	48
5.11	VisPD-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110}+\text{H}]^+$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110}+\text{H}]^+$ (beide m/z 1168,4).	49
5.12	Fragmente mit Saccharidanteil von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110}+\text{H}]^+$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110}+\text{H}]$	49
5.13	CID Spektrum von (oben) $[\text{LNFPI}+\text{H}]^+$ und (unten) $[\text{LNFPII}+\text{H}]^+$ (beide m/z 854,3).	50
5.14	CID-Spektrum von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110}+\text{H}]^+$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110}+\text{H}]^+$ (beide m/z 1168,4).	51
5.15	VisPD-Spektrum (oben) und CID-Spektrum (unten) von $[\text{LNFPI-AMQ}+\text{H}]^+$ (m/z 983,4).	53
5.16	Fragmente mit Saccharidanteil von $[\text{LNFPI-AMQ}+\text{H}]^+$ bei der CID und VisPD.	53
5.17	Übersichtsspektrum von LNFP II mit Zugabe von 6-Aminoquinolin . . .	54
5.18	VisPD-Spektrum des Clusters $[\text{LNFPII}+\text{AMQ}+\text{H}]^+$ (m/z 998,4).	55
6.1	CID-Spektrum des Clusters $[\text{2LNFPII}+\text{Rh110}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ (1039,4).	62
6.2	Übersichtsspektrum von 10 μM LNFP I in Wasser	63
6.3	Ausschnitte von verschiedenen Bereichen des Massenspektrums von 10 μM LNFP II in Wasser	64
6.4	Links: Übersichtsspektrum von 10 μM LNFP II in $\text{MeOH:H}_2\text{O:HCOOH}$. . .	64
6.5	Links: Übersichtsspektrum von 10 μM Maltopentaose in Wasser; rechts: Übersichtsspektrum von 10 μM LS-Tetrasaccharid c in Wasser.	65
6.6	Fragmentierungseffizienzen verschiedener Adduktionen von LNFP II bei Laserintensitäten von 0 % bis 90 %	66

6.7	Übersichtsspektren mit Zugabe von Alkaliionen (100 μ M) zu 10 μ M LNFP II in H ₂ O.	67
6.8	IRMPD-Spektren von LNFP II	68
6.9	CID-Spektren von LNFP II	69
6.10	CID-Spektrum von [2LNFP _{II} +H+Na] ²⁺ (m/z 865,3).	70
6.11	CID-Spektren von (oben) [2LNFP _I +H+K] ²⁺ und (unten) [2LNFP _{II} +H+K] ²⁺ 71	
6.12	Fragmente von [2LNFP _I +H+K] ²⁺ und [2LNFP _{II} +H+K] ²⁺	72
6.13	CID-Spektrum von [3LNFP _{II} +2Na] ²⁺ (m/z 1302,9).	73
6.14	IRMPD-Spektren von (oben) [3LNFP _I +H+K] ²⁺ und (unten) [3LNFP _{II} +H+K] ²⁺ (beide m/z 1299,9).	73
6.15	IRMPD-Spektrum von [2LNFP _{II} +H+NH ₄] ²⁺ (m/z 862,8 m/z).	75
6.17	Fragmente von [2LNFP _I +Sr] ²⁺ und [2LNFP _{II} +Sr] ²⁺	75
6.16	CID-Spektren von (oben) [2LNFP _I +Sr] ²⁺ und (unten) [2LNFP _{II} +Sr] ²⁺	76
6.18	CID-Spektren von (oben) [2LNFP _I +Ba] ²⁺ und (unten) [2LNFP _{II} +Ba] ²⁺	77
6.19	Fragmente von [2LNFP _I +Ba] ²⁺ und [2LNFP _{II} +Ba] ²⁺	77
6.20	CID-Spektren von (oben) [3LNFP _I +Sr] ²⁺ (m/z 1324) und (unten) [3LNFP _I +Ba] ²⁺ (m/z 1349).	78
7.1	LNFP I ohne Zugabe von Additiven (oben links), mit Zugabe von Li ⁺ (oben rechts)	84
7.2	VisPD-Spektrum von (oben) [LNFP _I -Rh110+Na] ⁺ und (unten) [LNFP _{II} - Rh110+Na] ⁺ (beide m/z 1190,4).	85
7.3	Fragmente von (oben) [LNFP _I -Rh110+Na] ⁺ und (unten) [LNFP _{II} -Rh110+Na] ⁺ bei der CID und VisPD.	86
7.4	VisPD-Spektren von (oben) [LNFP _I -Rh110+K] ⁺ , (unten) [LNFP _{II} -Rh110+K] ⁺ (beide m/z 1206,3).	87
7.5	Fragmente von (oben) [LNFP _I -Rh110+K] ⁺ und (unten) [LNFP _{II} -Rh110+K] ⁺ bei der CID und VisPD.	88
7.6	VisPD-Spektrum von (oben) [LNFP _I -Rh110+H+Li] ²⁺ und (unten) [LNFP _{II} - Rh110+H+Li] ²⁺	88
7.7	Fragmente von (oben) [LNFP _I -Rh110+H+Li] ²⁺ und (unten) [LNFP _{II} - Rh110+H+Li] ²⁺	89
7.8	CID-Spektren von (oben) [LNFP _I -Rh110+H+Li] ²⁺ und (unten) [LNFP _{II} - Rh110+H+Li] ²⁺	90

7.9	VisPD-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+Na}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+Na}]^{2+}$	91
7.10	Fragmente von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+Na}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+Na}]^{2+}$	92
7.11	CID-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+Na}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+Na}]^{2+}$	93
7.12	VisPD-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+2Na}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+2Na}]^{2+}$	94
7.13	CID-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+2Na}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+2Na}]^{2+}$	95
7.14	VisPD-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+K}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+K}]^{2+}$	96
7.15	Fragmente von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+K}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+K}]^{2+}$	97
7.16	CID-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110+H+K}]^{2+}$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110+H+K}]^{2+}$	98
8.1	CID-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-H}]^-$ (m/z 827,3).	104
8.2	Fragmente von $[\text{MP-H}]^-$ bei der CID.	104
8.3	VisPD-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-Rhodamin110-H}]^-$ (m/z 1141,4).	105
8.4	Fragmente von $[\text{MP-Rh110-H}]^-$ und $[\text{MP-2AT-H}]^-$ bei der CID und VisPD.	106
8.5	CID-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-Rhodamin110-H}]^-$ (1141,4 m/z).	106
8.6	VisPD-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-2AT-H}]^-$ (m/z 1036,4).	107
8.7	CID-Spektrum von $[\text{Maltopentaose-2-Aminoazotoluol-H}]^-$ (m/z 1036,4).	107
8.8	CID-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-H}]^-$ und (unten) $[\text{LNFPII-H}]^-$ (beide 852,3 m/z).	108
8.9	Fragmente von $[\text{LNFPI-H}]^-$ und $[\text{LNFPII-H}]^-$ bei der CID.	109
8.10	VisPD-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rhodamin110-H}]^-$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rhodamin110-H}]^-$ (beide m/z 1166,4).	109
8.11	Fragmente von (oben) $[\text{LNFPI-Rh110-H}]^-$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rh110-H}]^-$	110
8.12	CID-Spektren von (oben) $[\text{LNFPI-Rhodamin110-H}]^-$ und (unten) $[\text{LNFPII-Rhodamin110-H}]^-$ (beide m/z 1166,4).	111
A.1	UV-Spektrum in EtOH von Rhodamin 110 (Rh110), Maltopentaose-Rhodamin110 (MP-Rh110) und LNFPI-Rhodamin110 (LNFPI-Rh110).	126

A.2	Übersichtsspektren von LNFPI-6-Aminoquinolin	126
A.3	UV-Spektrum von 6-Aminoquinolin in EtOH ohne Zugabe (AMQ: schwarz) und mit Zugabe von HCl (AMQ sauer: blau).	127
A.4	Auftragung der Signalintensität von [Maltopentaose-Rhodamin110+H] ⁺ gegen die Laserleistung bei 488 nm.	128
A.5	VisPD-Spektren von [Maltopentaose-Rhodamin110+H] ⁺ bei unterschied- lichen Wellenlängen	129
B.1	Übersichtsspektrum von 10 µM LNFPII unter Verwendung von MeOH:H ₂ O (1:1 v/v) als ESI-Lösungsmittel.	137
B.2	Auftragung der Signalintensität von [Maltopentaose - H] ⁻ gegen die La- serleistung bei 488 nm	138
B.5	Ausschnitte eines Übersichtsspektrums von 10 µM LNFPII in Wasser . . .	138
B.3	Übersichtsspektren von LNFPII bei unterschiedlichem m/z-Fokus	139
B.13	CID-Spektren von (oben) [LNFPI-Rh110+K] ⁺ (m/z = 1206,3), (unten) [LNFPI-Rh110+K] ⁺	139
B.4	Ausschnitt der Übersichtsspektren von (links) Maltopentaose und (rechts) LS-Tetrasaccharid c.	140
B.6	Intensität der Adduktionen bei Zugabe von Li ⁺ , Na ⁺ und K ⁺	140
B.7	LS-Tetrasaccharid c	141
B.8	CID-Spektrum von [LNFPII+NH ₄] ⁺ (m = 871,3 m/z).	141
B.9	Übersichtsspektren mit Zugabe von Ammoniumionen	141
B.10	Intensität verschiedener Adduktionen.	142
B.11	Oben) Spektrum von 10 µM LNFPII mit Zugabe von 100 µM Sr ²⁺	142
B.12	CID-Spektren von (oben) [LNFPI-Rh110+Na] ⁺ (m/z = 1190,3), (unten) [LNFPI-Rh110+Na] ⁺	143

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer für die Aufnahme in den Arbeitskreis bedanken. Besonders möchte ich ihm für die Unterstützung in den letzten Wochen danken.

Bei Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst möchte ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Ich möchte Jonathan Peters, Tassilo Muskat und Hannes Schüttig für die fachliche Unterstützung danken.

Und ich danke Frauke Kutscha für die Unterstützung in allen organisatorischen Belangen, ihre Freundlichkeit und ihre Herzlichkeit.

Ich danke Uwe Eggers für die Gespräche und die Aufmunterung.

Für die Hilfe in den Bereichen Computer, Elektronik und Technik möchte ich außerdem noch Michael Karstens, Klaus Warns und Carsten Grun danken.

Bei meinen Kollegen und den ehemaligen Kollegen möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Ich danke Lena Fernando für die Aufnahme in den roten Salon, das gemeinsame Schreiben und alles andere.

Freunden und vor allen den Korrekturlesern danke ich für die Unterstützung in den letzten Wochen.

Ich halte mich hier einfach kurz und komme vorbei, um mich richtig zu bedanken.

Mein größter Dank gilt noch Paul, Heinke und meiner Familie!

Erklärung

Diese Arbeit wurde von Januar 2009 bis April 2013 am Institut für Physikalische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer bearbeitet. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Die Arbeit wurde von mir nicht an anderer Stelle eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Andrea Hahn